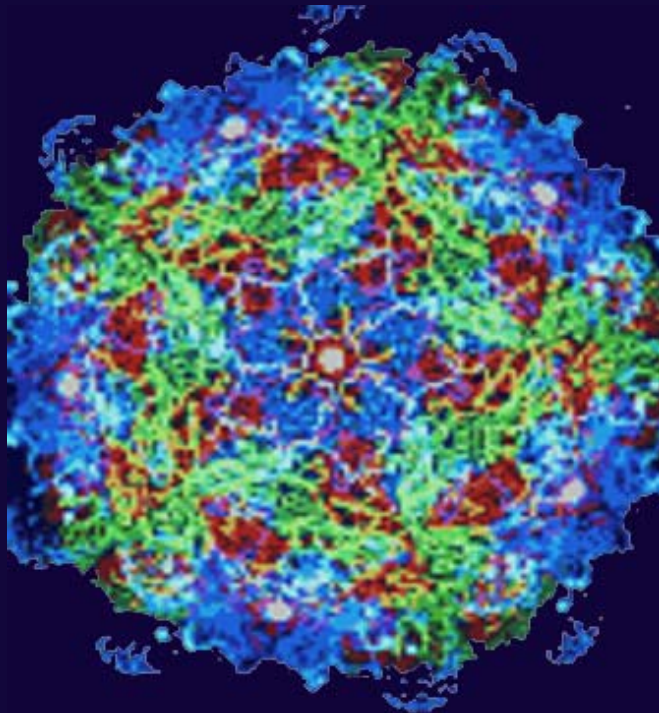




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Departamento de Biología Molecular
Facultad de ciencias



**DESARROLLO DE NUEVAS ESTRATEGIAS DE VACUNACIÓN
FRENTE AL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA BASADAS EN
PÉPTIDOS SINTÉTICOS**

TESIS DOCTORAL

CAROLINA CUBILLOS ZAPATA
Madrid, 2009



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Departamento de Biología Molecular
Facultad de ciencias

**DESARROLLO DE NUEVAS
ESTRATEGIAS DE VACUNACIÓN
FRENTE AL VIRUS DE LA FIEBRE
AFTOSA BASADAS EN PÉPTIDOS
SINTÉTICOS**

TESIS DOCTORAL

CAROLINA CUBILLOS ZAPATA

Madrid, 2009



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Departamento de Biología Molecular
Facultad de ciencias

Memoria presentada para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas por

Carolina Cubillos Zapata
Universidad Autónoma de Madrid
Febrero de 2009

Este trabajo ha sido financiado por una beca del Plan Nacional de Formación de Investigadores del Ministerio de Educación y Ciencia.

Directores de Tesis:

Dr. Juan Bárcena del Riego
C.I.S.A.-I.N.I.A.

Dra. Esther Blanco Lavilla
C.I.S.A.-I.N.I.A.

A mis padres y hermano

Agradecimientos

Mi mayor agradecimiento esta dedicado a Esther Blanco por la dirección, ayuda e interés en esta tesis, por muchos detalles que han hecho que durante estos casi cinco años de trabajo en el CISA hayan resultado gratos. A Juan Barcena por su ayuda en esta tesis, por haberme enseñado a trabajar con rigor y por haberme ofrecido la oportunidad de realizar esta tesis.

A mis ex-compañeras de laboratorio, Ivonne Avalos, Alicia Llorente, que fueron mi compañía y alegría durante el día a día en momentos personales que fueron difíciles.

A mis compañeros de laboratorio Horacio Almanza, Beatriz Guerra, Yoly y a todos mis compañeros de otros grupos que de una u otra forma han colaborado o me han acompañado o apoyado durante mi estancia en el CISA.

A Tony por todas las veces que me ha llevado al laboratorio con la mejor de las voluntades. A Nazareth por su eficiente ayuda en la biblioteca.

A Laurence Guzylack y Leslie Saurer, Artur Sammurfield, Ken McCullough y demás compañeros durante mis estancias en IVI (Suiza), por alegrarme con su compañía y por apoyarme en mi formación científica.

Pero sobretodo y seguramente lo más importante a mi familia por ser maravillosa y todos los sacrificios que han hecho por mi y el apoyo que me han dado durante mucho tiempo para que yo pudiese continuar con el desarrollo de esta tesis. También a la familia Goldberg que me ha ayudado y a quien tengo mucho cariño. A Borja a quien adoro y es mi compañía.

ÍNDICE

1. ABSTRACT	1
2. ABREVIATURAS	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1. VFA MODELO EN EL DESARROLLO DE VACUNAS	3
3.2. VACUNACIÓN	4
3.2.1. Introducción	4
3.2.2. Características generales del sistema inmune	5
3.2.2.1. Respuesta humoral	6
3.2.2.2. Respuesta celular	7
3.2.3. Nuevas estrategias de vacunación	12
3.2.3.1. Vacunas DIVA	12
3.2.3.2. Vacunas nueva generación	12
3.2.3.3. Vacunas peptídicas	17
3.3. EL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA.....	17
3.3.1. La enfermedad	17
3.3.2. Control de la enfermedad	18
3.3.3. El virus	20
3.3.4. Respuesta immune frente al VFA	22
3.3.4.1. Respuesta humoral	22
3.3.4.2. Respuesta celular	24
4. OBJETIVOS.....	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1. MATERIALES	27
5.1.1. Células	27
5.1.2. Virus	27
5.1.3. Péptidos sintéticos	27

5.1.4. Animales	27
5.1.5. ELISAs	28
5.1.6. Análisis de ácidos nucleicos	29
5.1.7. Medios de cultivo y suplementos	30
5.1.8. Isótopos radioactivos y mitógenos	31
5.1.9. Material de plástico y vidrio	31
5.1.10. Tampones, mezclas de reacción y sustratos	31
5.1.11. Otros	32
5.2. MÉTODOS	33
5.2.1. Células	33
5.2.1.1. Cultivos y mantenimiento de líneas celulares	33
5.2.1.2. Obtención de CMSP porcinas	33
5.2.2. Producción de antígenos e inmunógenos	33
5.2.3. Inmunización e inoculación de animales	34
5.2.4. Ensayos de caracterización de la respuesta humoral	35
5.2.4.1. Seroneutralización	35
5.2.4.2. ELISAs	35
5.2.5. Ensayos de caracterización de respuesta celular	36
5.2.5.1. Ensayos de linfoproliferación	36
5.2.5.2. Detección de citoquinas porcinas	37
5.2.6. Análisis y detección del VFA mediante RT-PCR	37
5.2.6.1. Extracción de RNA viral	37
5.2.6.2. Obtención y amplificación del cDNA (RT-PCR)	38
6. RESULTADOS.....	39
6.1. ANÁLISIS DE LA INMUNOGENICIDAD Y PROTECCIÓN INDUCIDAS EN CERDO POR PÉPTIDOS LINEALES QUE REPRODUCEN EPÍTOPOS T Y B DEL VFA	39
6.1.1. Protección frente al VFA	40
6.1.2. Detección de RNA del VFA en muestras biológicas tras el desafío	42
6.1.3. Respuesta inmune humoral inducida por los péptidos lineales	44
6.1.4. Respuesta inmune celular inducida por los péptidos lineales	46

6.2. ANÁLISIS DE LA INMUNOGENICIDAD Y PROTECCIÓN INDUCIDA EN CERDO POR UN PÉPTIDO DENDRIMÉRICO QUE REPRODUCE UN EPÍTOPO T Y UNO B DEL VFA	47
6.2.1. Diseño y síntesis del péptido dendrimérico B₄T	49
6.2.2. Protección frente al VFA	49
6.2.3. Detección de RNA del VFA en muestras biológicas tras el desafío.....	51
6.2.4. Respuesta inmune humoral inducida por el dendrímero B₄T	52
6.2.5. Respuesta inmune celular inducida por el dendrímero B₄T	55
6.2.6. Inmunización con el dendrímero B₄T permite diferenciar animales infectados y vacunados.....	59
 7. DISCUSIÓN.....	 60
7.1. LA INMUNIZACIÓN CON EL PÉPTIDO LINEAL TB (3A[21-35]-VP1[136-154]) INDUCE PROTECCIÓN PARCIAL Y REDUCE LA EXCRECCIÓN DE VIRUS TRAS EL DESAFÍO.....	62
7.2. LA INMUNIZACIÓN CON EL PÉPTIDO DENDRIMÉRICO B₄T POTENCIA LA RESPUESTA IgA ESPECÍFICA EN MUCOSAS Y CONFIERE PROTECCIÓN TOTAL FRENTE AL VFA.....	67
 8. CONCLUSIONES.....	 72
 9. BIBLIOGRAFÍA	 73
 10. ANEXO I	 82

1. ABSTRACT

Foot-and-mouth disease virus (FMDV) is a causative agent of highly infectious and economically important disease of cattle, sheep, pigs and cloven-hoofed wildlife species. Despite low mortality rates, FMD severely decreases livestock production and is a major constraint to international trade in live animals and their products. The disease affects extensive areas of the world, is endemic in parts of the Middle East, Africa, Asia, and South America, and increased global trade and movement of people (legal and illegal), provide opportunities for the virus to spread.

FMD control in endemic areas is implemented by regular vaccination, using chemically inactivated whole-virus vaccines, effective to reduce the impact of FMD. However, conventional vaccines have important disadvantages, such as the requirement of a cold-chain to preserve vaccine stability, the risk of viral release during vaccine production and the problems for serological distinction between infected and vaccinated animals.

These limitations and the information available on the genomic organisation have favoured FMDV becoming a model system for the development of new vaccines.

This doctoral thesis describes the design, immunogenicity and successful protection conferred to pigs by linear and dendrimeric peptides, displaying FMDV T- and/or B-cell epitopes. The B-cell epitope used was located in the GH loop (site A), between positions 136-154 of capsid protein VP1. This epitope was alone or co-linearly synthesized with a T-cell epitope corresponding to NSP 3A residues 21-35. In order to enhance the immunogenicity induced by these linear peptides, we designed a multimeric structure (dendrimeric peptide), displaying in a single molecule four copies of the VP1 B-cell epitope joined to a T-cell epitope from NSP 3A, through a lysine tree plus two additional Lys residues, defining a putative cleavage site for cathepsin D. This protease has been suggested to be involved during *in vivo* MHC class II antigen processing. Outbred pigs were immunized with these peptides by intramuscular route and challenged by intradermal inoculation of FMDV.

The peptides constructed, specifically induced significant titers of FMDV-neutralizing antibodies and activated FMDV-specific T cells. Partial protection was observed in immunized pigs with linear peptides (B and TB peptides) after challenge. Despite these peptides failed to completely protect pigs, interestingly we detected a reduction on FMDV excretion after challenge, more significant in pigs immunized with linear peptide including a specific T-cell epitope.

The presentation of selected B- and T-cell epitopes in a multimeric construction, allowed the enhancement of the effectiveness conferred by linear peptides. The dendrimeric peptide constructed successfully protected completely pigs against challenge with FMDV. The pigs immunized with dendrimer did not develop significant clinical signs, neither systemic nor mucosal FMDV replication, nor was its transmission to contact control pigs observed. Interestingly, a potent anti-FMDV IgA response (local and systemic) was observed, despite the parenteral administration of the peptide. Moreover, the dendrimeric peptide immunized pigs showed no antibodies specific of FMDV infection, which qualifies the dendrimeric peptide as a potential marker vaccine.

Overall, the dendrimeric peptide used elicited an immune response comparable to that found for control FMDV-infected pigs that correlated with a solid protection against FMDV challenge. Dendrimeric designs of this type may hold substantial promise for peptide subunit vaccine development.

2. HOJA DE ABREVIATURAS

A ₄₉₂	Absorbancia a 492 nm
Ac	Anticuerpo.
AcMo	Anticuerpo monoclonal.
CD4+	Linfocitos T fenotipo CD4
CD8+	Linfocitos T fenotipo CD8
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario.
Ci	Curio.
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica.
CPE	Efecto citopático.
CPA	Células presentadoras de antígeno
cpm	Cuentas por minuto.
CTL	Respuesta citotóxica
DIVA	Differentiating infected from vaccinated animals
DO	Densidad óptica.
dpi	Días post-infección.
EDTA	Acido etilén diaminotetraacético
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (Enzimoinmunoensayo)
FA	Fiebre Aftosa.
FACS	Analizador de células activado por fluorescencia.
Fig.	Figura.
IE	Índice de estimulación
IL2	Interleuquina 2
IL4	Interleuquina 4
IL6	Interleuquina 6
IL10	Interleuquina 10
IFN γ	Interferón gamma
MHC.	Complejo de histocompatibilidad
MHC I	Complejo de histocompatibilidad clase I
MHC II	Complejo de histocompatibilidad clase II
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico, ARN).
Ref.	<i>Referencia comercial del reactivo.</i>
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Reverse transcription/ transcriptase (transcripción inversa; también transcriptasa reversa).
SFB	Suero fetal bovino.
SLA	Complejo de histocompatibilidad denominado en cerdo
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> .
TCR	Receptor específico de los linfocitos T
Th1	Respuesta inmune celular
Th2	Respuesta inmune humoral
TNF β	Factor de necrosis tumoral β
UE	Unión Europea
VEHC	Virus de la enfermedad hemorrágica del conejo
VFA	Virus de la Fiebre Aftosa.
VLP	Virus-like particle (partícula viral vacía).
VP1	Proteína VP1 estructural del virus de la Fiebre Aftosa.

3. INTRODUCCIÓN

3.1- VFA MODELO EN EL DESARROLLO DE VACUNAS

El virus de la fiebre aftosa (VFA) ha sido uno de los primeros sistemas virales empleados como modelo para el desarrollo de vacunas sintéticas, tanto recombinantes como peptídicas. Su utilización se ha visto favorecida por la importancia de la enfermedad que produce, la fiebre aftosa (FA), las limitaciones de las vacunas convencionales existentes y por tratarse de un virus sencillo estructuralmente del que se conoce la secuencia aminoacídica completa de todas sus proteínas, la estructura tridimensional de sus viriones, así como los principales sitios antigénicos B. Todo ello hace que se disponga de amplia información sobre los resultados de distintos intentos de inmunización frente a la FA utilizando diferentes vacunas sintéticas (Bittle y cols, 1982; Di Marchi y cols, 1986; Clarke y cols, 1987; Francis y cols, 1991; Taboga y cols, 1997; Grubman y cols, 2005).

El VFA es responsable de una de las enfermedades de mayor importancia a nivel mundial por su rápida y fácil difusión y por ser la epizootia del ganado doméstico que produce mayores pérdidas económicas. La OIE (Organización Internacional de Epizootias) ha clasificado esta enfermedad dentro de las enfermedades prioritarias y por tanto su control y erradicación constituye un objetivo de gran importancia en la sanidad animal mundial.

Hasta el momento, el control y prevención de la enfermedad se realiza utilizando vacunas producidas a partir de virus completo inactivado (Barteling y Vreeswijk, 1991), cuya efectividad está limitada por diversas razones, como se discute más adelante. Por tanto, el desarrollo de una vacuna que supere los inconvenientes de las disponibles hasta el momento representa un objetivo útil y adecuado. Además, es razonable esperar que la información obtenida pueda ser empleada para el control de otras patologías relacionadas.

En esta Tesis se ha desarrollado una estrategia de vacunación frente al VFA basada en la utilización de péptidos sintéticos lineales, que reproducen epítopos B y T del virus. La valoración de la eficacia de estas vacunas peptídicas se ha realizado en el cerdo, hospedador natural del VFA, lo que nos ha permitido obtener resultados de potencial relevancia práctica.

3.2- VACUNACION

3.2.1- INTRODUCCION

Las vacunas, cuando existen, constituyen sin duda el método más eficaz de prevención y control de las enfermedades infecciosas. El concepto de vacunación fue introducido en el siglo XIX después de que Edward Jenner realizara con éxito la primera inmunización experimental, demostrando que la inoculación con el virus vaccinia protegía de infecciones posteriores con el virus de la viruela (smallpox), lo que ilustra además la estrecha relación que existe entre las enfermedades infecciosas animales y humanas. Desde entonces se han venido empleando las llamadas vacunas convencionales o clásicas, que pueden ser inactivadas o atenuadas (vacunas vivas). Las primeras están basadas en el uso de patógenos completos inactivados, mientras que las segundas emplean variantes del agente causal con una baja o nula patogenicidad.

Uno de los ejemplos más notables de la eficacia de estas vacunas es la erradicación de la viruela en 1977. Además, el empleo de este tipo de vacunas ha permitido disminuir la incidencia y mejorar el control de muchas enfermedades tanto humanas como animales (Mahon y cols, 1998; Del Giudice y cols, 2003; Meeussen y cols, 2007). Sin embargo, y a pesar de los buenos resultados obtenidos con el empleo de estas vacunas, su utilización y eficacia es en otros muchos casos limitada, por la existencia de inconvenientes. Por ejemplo, la necesidad de refrigeración para su almacenamiento, exigencia que limita el uso de dichas vacunas en zonas poco desarrolladas, donde mantener la cadena del frío resulta problemático. Otros inconvenientes son el riesgo de reversión de virus a formas virulentas o de contaminación con otros patógenos en el caso de las vacunas atenuadas, o el riesgo de una deficiente inactivación o de escape viral de las plantas de producción en el caso de las vacunas inactivadas (Beck y Strohmaier, 1987; Carrillo y cols, 1990; Enserink, 2007).

Durante las últimas décadas se ha producido un espectacular avance en el conocimiento de la estructura y propiedades biológicas de muchos sistemas virales, lo cual junto con la disponibilidad de vectores para la expresión de proteínas foráneas y una mayor información de los mecanismos inmunes implicados en la defensa del hospedador, ha permitido el inicio de una nueva era en el diseño de vacunas. Una de las estrategias seguidas para la mejora de vacunas consiste en identificar aquellos componentes virales,

polipéptidos o fragmentos de proteínas inmunogénicas, que administradas de forma aislada (Vacunas de subunidades) emulen, en la mayor medida posible, la respuesta inmune inducida por el virus completo.

3.2.2- CARACTERISTICAS GENERALES DEL SISTEMA INMUNE

El sistema inmunitario constituye la línea de defensa de los organismos vivos frente a los patógenos. Su función principal consiste en evitar la colonización, multiplicación e invasión de los tejidos por parte de agentes extraños. Para realizar este cometido, el sistema inmune posee la capacidad de reconocer y discriminar las estructuras propias de las ajenas, caracterizándose por su especificidad y memoria. La respuesta inmune se desarrolla en tres pasos: i) el reconocimiento de manera inespecífica y específica del agente extraño por parte de los fagocitos, linfocitos T y B y otros tipos celulares; ii) la regulación a través de la interacción de los diferentes elementos del sistema inmunitario para que se activen y regulen, y iii) desarrollo de mecanismos efectores del tipo e intensidad adecuada para la eliminación o inactivación del agente extraño.

Dentro del proceso de reacción frente a patógenos, la respuesta inmunitaria por parte del hospedador se puede clasificar en respuesta innata (natural o inespecífica) y adquirida (adaptativa o específica).

La respuesta innata, se desencadena al poco tiempo de la entrada del patógeno y predomina en las primeras fases de una infección, teniendo una gran importancia en la protección sistémica y local del organismo (Euzeby, 1993). Está constituida por las barreras físicas y agentes químicos no específicos (piel, mucosas, saliva, enzimas proteolíticas, etc.), los factores solubles que recubren e inactivan inespecíficamente patógenos (proteínas del complemento), así como por células (monocitos / macrófagos, polimorfonucleares, células citotóxicas, K, etc.) que reconocen inespecíficamente a los microorganismos o a células que se encuentran infectadas (Abbas y cols, 1991b; Rumyantsev, 1998).

Sin embargo, la respuesta adaptativa se caracteriza por la especificidad y la capacidad de memoria, que permite una activación de la respuesta más rápida en una segunda exposición. La respuesta adaptativa depende de los linfocitos B y T, y consta de una respuesta primaria que es de baja intensidad y corta duración, y de una respuesta secundaria o anamnésica, que se caracteriza por ser más rápida, potente y efectiva.

Dentro del proceso de la respuesta específica puede distinguirse un componente humoral, basado en la producción de anticuerpos, y un componente celular, basado en mecanismos de citotoxicidad.

3.2.2.1- RESPUESTA HUMORAL

La respuesta humoral esta mediada fundamentalmente por los linfocitos B, los cuales mediante receptores específicos de antígeno (Ig de membrana), son capaces de reconocer los antígenos foráneos en su conformación nativa. Este reconocimiento, junto con la cooperación de los linfocitos T estimulados específicamente, activa los linfocitos B, que proliferan específicamente y maduran a células plasmáticas productoras de Acs (Igs con la misma especificidad que las Igs de membrana). Además, tras la proliferación, una parte de los linfocitos permanecen como células de memoria que expresan en su superficie el receptor específico y que presentan una mayor afinidad por el antígeno. Estas células de memoria, tras una segunda activación, se diferencian en células plasmáticas productoras de anticuerpos, en este caso de distintos tipos. El isotipo de los Acs producidos será diferente según el tipo de activación celular T que se produzca (Abbas y cols, 1991b).

En el cerdo se han descrito cuatro tipos de inmunoglobulinas: IgG, IgM, IgA e IgE. La IgM es la primera inmunoglobulina que se produce durante el desarrollo fetal y es el isotipo predominante en una respuesta primaria (Buttler y cols, 1998).

En el cerdo, la IgG es la principal inmunoglobulina presente en el suero y calostro. Representa aproximadamente el 70% total de las inmunoglobulinas del organismo, produciéndose de manera muy intensa en pocas horas. Tiene gran afinidad por el antígeno y es la Ig dominante en la respuesta inmune secundaria. Se puede unir a receptores específicos de macrófagos, polimorfonucleares, y otras CPA, incrementando su capacidad de fagocitosis y la producción y liberación de citoquinas.

La IgA predomina en las mucosas y a menudo se asocia a un componente secretor elaborado por las células epiteliales que permite una unión a superficies de mucosas, siendo el anticuerpo más abundante en las secreciones corporales. Actúa básicamente en respuestas locales de la inmunidad de mucosas siendo la primera línea de defensa frente a patógenos cuya invasión se produce a través de superficie de mucosas. (Van. Ginkel y cols, 2000; Van Der Stede y cols, 2004; Lavelle y cols, 2005, Brandtzaeg y cols, 2007)

3.2.2.2- RESPUESTA CELULAR

Este tipo de respuesta está mediada por los linfocitos T, que a diferencia de los B, sólo reconocen el antígeno una vez procesado y asociado a moléculas propias del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC, denominado SLA en el cerdo) (Abbas y cols, 1991a). Este requerimiento introduce lo que se denomina restricción impuesta por el MHC, puesto que dentro de una población polimórfica respecto al MHC expresado por las células, diferentes individuos pueden reconocer diferentes regiones de una proteína. Esta restricción MHC es especialmente relevante en el diseño de vacunas de subunidades (Butcher, 1994). Las moléculas de MHC son glicoproteínas de membrana que presenta un enorme polimorfismo; se conocen más de 50 alelos para algunos *loci*. Los diferentes alelos se unen selectivamente a los péptidos procesados con distinta afinidad y son los responsables de las diferencias individuales que encontramos en una población en términos de susceptibilidad a una enfermedad (Weenink y cols, 1997).

Existen dos tipos distintos de moléculas de MHC, las de clase I que se expresan en la superficie de todas las células nucleadas, y las de clase II que aparecen únicamente en las CPA, células dendríticas, monocitos, macrófagos, linfocitos B y linfocitos T activados (Lunney. J, 1986; Vaiman y cols, 1998). Dependiendo de la vía de entrada de los antígenos en las CPA, la presentación se realizará asociada preferentemente al MHC clase I o al MHC clase II (Figura.3.1)

En la presentación de antígeno por clase II, al contrario que por clase I, las CPA (linfocitos B, macrófagos, células dendríticas, etc.), utilizan la vía endocítica, internalizan las proteínas exógenas y las procesan en diferentes compartimentos mediante la acción de diversas proteasas. Especialmente importantes son las catepsinas D y B, ya que son las predominantes en las vesículas tanto endosomales como lisosomales (Van Lierop y cols, 1994).

El receptor específico de los linfocitos T es el TCR, formado por un heterodímero constituido por dos cadenas, en combinaciones $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$, que se expresan asociados al complejo CD3. Entre el 40 y el 60% de los linfocitos T de sangre periférica poseen el receptor $\alpha\beta$ (Yang y Parkhouse, 1998) y pueden expresar además dos tipos de coreceptores: CD4 y CD8. Los linfocitos CD8 reconocen el antígeno expresado en células infectadas, asociado al MHC de clase I (Abbas y cols, 1991a). En general presentan una función citotóxica; tras activarse, lisan la célula infectada.

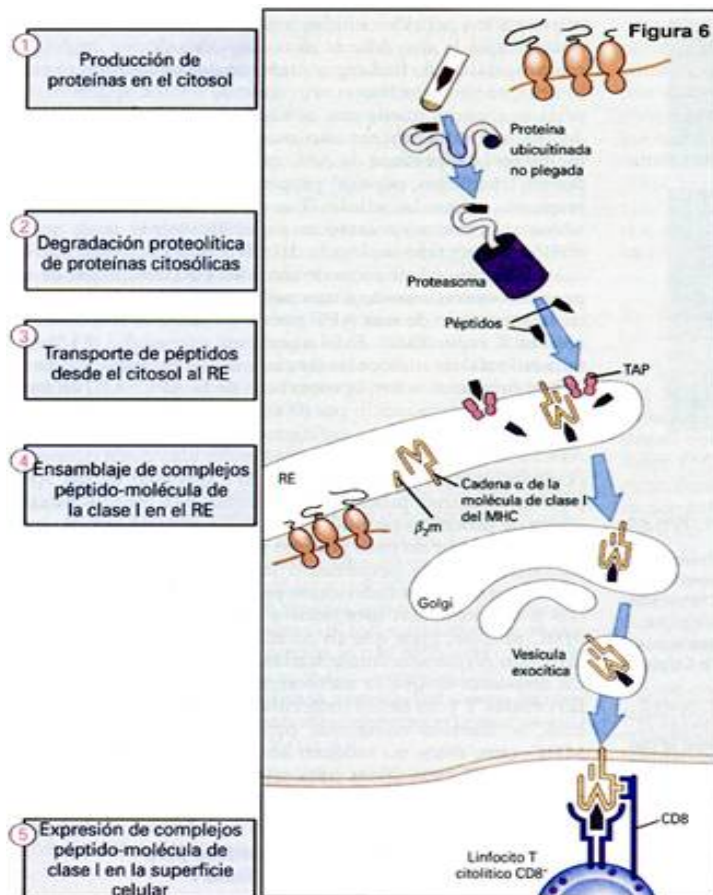


Fig. 3.1A- Mecanismo de procesamiento y presentación de antígeno por el MHC clase II.

Los antígenos exógenos son endocitados por las CPA y procesados proteolíticamente en los endosomas y lisosomas, generando péptidos que se unen a las moléculas de clase II en el compartimento endolisosómico. La molécula de MHC clase II se forma en el retículo endoplásmico por la unión de una cadena α y una β , y el sitio de unión al péptido se protege inicialmente por la cadena invariante (Ii). Aquellos péptidos con suficiente afinidad desplazarán la cadena Ii formando el complejo MHC-péptido, que será transportado a la superficie celular para ser reconocido por los linfocitos CD4⁺.

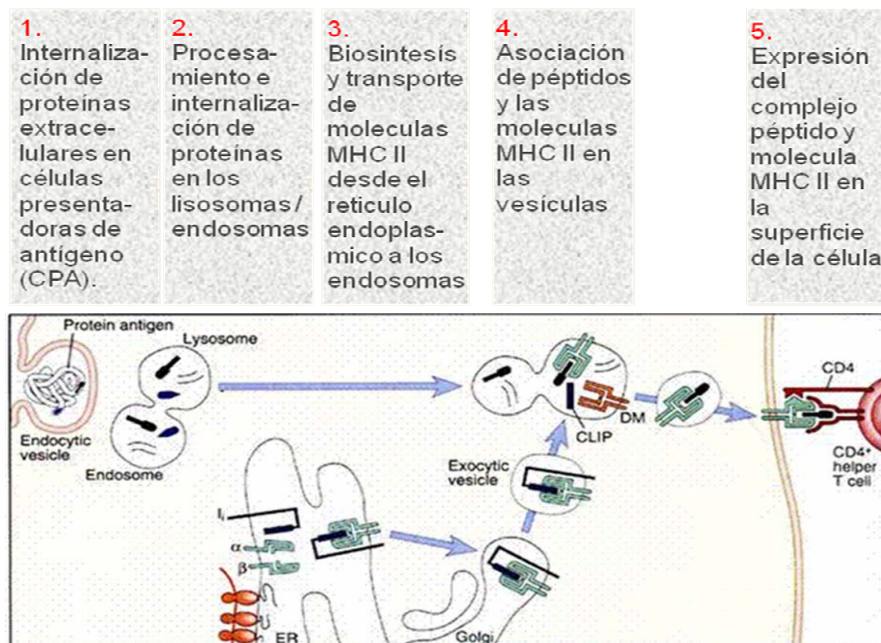


Fig. 3.1B- Mecanismo de procesamiento y presentación de antígeno por el MHC clase I

Péptidos derivados de proteínas citoplasmáticas sintetizadas en el interior de las células y procesadas principalmente por proteosomas, serán transportados al retículo endoplásmico mediante los complejos de transporte TAP. Estos complejos seleccionan los péptidos que se podrán unir a las moléculas de clase I, desplazando así la molécula de calnexina, que hasta ese momento estabilizaba la molécula.

Los linfocitos CD4 reconocen los epítomos T asociados a las moléculas del MHC de clase II y se asocian en general, a funciones cooperadoras que realizan tras la liberación de mediadores solubles (citoquinas), capaces de estimular la función citotóxica de los linfocitos CD8 o de potenciar la respuesta de los linfocitos B (Noelle y cols, 1990).

A diferencia de la mayoría de los mamíferos estudiados, cuyos linfocitos T periféricos expresan de forma excluyente uno u otro marcador, en el cerdo un porcentaje significativo de linfocitos expresa de forma simultánea ambos marcadores. El porcentaje de esta subpoblación doble positiva parece incrementarse con la edad, lo que apoya la tesis de que estas células incluyan los linfocitos T de memoria que se generan tras un proceso de maduración (Zuckerman y cols, 1996b; Zuckerman, 1999).

Por su parte, los linfocitos $\gamma\delta$ a menudo CD4, CD8 negativos, son escasos en sangre periférica, pero abundantes en mucosas (Zuckerman y Hussmann, 1996b). Estos linfocitos TCR $\gamma\delta$ son capaces de reconocer los antígenos fuera del contexto del MHC (Haas y cols, 1993; Saalmuller, 1998). Se ha observado que su proporción disminuye con la edad y aunque su función no está del todo clara, parece que tienen un papel relevante en protección de las mucosas y en actividades citolíticas (Saalmuller, 1998). Además, se ha observado que estos linfocitos $\gamma\delta$ son capaces de reconocer antígenos directamente, sin la presentación por CPA y algunas subpoblaciones pueden actuar incluso como presentadores de antígeno a linfocitos T cooperadores vía el MHC-II (Takamatsu y cols, 2002).

Para conseguir una estimulación efectiva de las células T que conduzca a una diferenciación y proliferación de las mismas, son necesarias dos señales independientes. La primera se produce vía interacción del receptor TCR, con el complejo formado por el MHC-antígeno, mientras que la segunda señal está peor definida y depende mucho del tipo de célula y del estado de diferenciación de la misma en el momento de la estimulación. Esta señal de coestimulación puede ser realizada por una amplia gama de moléculas denominadas moléculas accesorias como son B7/CD28, IL-1 o LFA-1/ICAM (Liu and Linsley, 1992). En ausencia de esta segunda señal, la unión del TCR al complejo MHC-antígeno induce solo una activación parcial de las células T que conduce a un estado de no respuesta (anergia) (Evavold y cols, 1993; Sette y cols, 1994). Los linfocitos T tras su activación, expresan nuevas moléculas de superficie que se conocen como antígenos de activación. Estas moléculas son muy útiles como marcadores de poblaciones activadas en estudios inmunológicos de distintas patologías.

De todos los antígenos de activación definidos en otras especies animales, en el cerdo sólo se ha caracterizado por el momento el CD25, que corresponde a la subunidad α del receptor de IL-2 (citoquina responsable de la expansión clonal de estos linfocitos) (Bailey y cols, 1993).

Dentro del proceso de la respuesta inmune específica, las células del sistema inmune producen diversos mediadores solubles denominados citoquinas, que regulan la respuesta inmune, controlando los procesos de activación, crecimiento y diferenciación celular. Estos mediadores constituyen un mecanismo de amplificación que permite que un número pequeño de linfocitos activados de forma específica por un determinado antígeno pueda poner en marcha una gran variedad de mecanismos efectores que permitan eliminar dicho antígeno (Abbas y cols, 1991c).

En algunas especies animales, como el ratón, los linfocitos CD4 pueden polarizarse en sus acciones, en función del patrón de citoquinas que producen, favoreciendo la respuesta inmune celular (Th1) o humoral (Th2).

Los linfocitos Th1 produce mayoritariamente interleuquina-2 (IL-2), interferon- γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral- β (TNF- β), citoquinas que promueven principalmente una respuesta de tipo celular, activando linfocitos CD8 y Natural Killer.

La supoblación Th2 es productora de IL-4, IL-6 e IL-10, que favorecen el desarrollo de la respuesta humoral (Mossman y cols, 1989; Abbas y cols, 1991c).

En este proceso de polarización Th1 / Th2, un tipo de respuesta suele inhibir al otro, mediante citoquinas específicas (Roitt y cols, 2001) (Figura 3.2).

Algunas de estas citoquinas tienen un papel relevante por su actividad antivírica, como el IFN- γ . Entre sus múltiples efectos biológicos, el IFN- γ es el principal activador de macrófagos, potenciando su actividad antimicrobiana y su capacidad para procesar y presentar antígenos a los linfocitos T. Además, regula el isotipo de las inmunoglobulinas actuando sobre los linfocitos B (Rodríguez-Carreño y cols, 2002).

En humanos, cerdos y roedores esta citoquina es producida fundamentalmente por linfocitos T y células NK. En cerdos jóvenes (hasta 6 meses) el porcentaje de linfocitos de sangre periférica capaces de producir IFN- γ tras una estimulación con mitógeno es del 13.2 %, la mayoría de ellos linfocitos $\alpha\beta$ del fenotipo CD4+CD8+ correspondiente a células de memoria, (Zuckermann y cols, 1996b; Rodríguez-Carreño y cols, 2002).

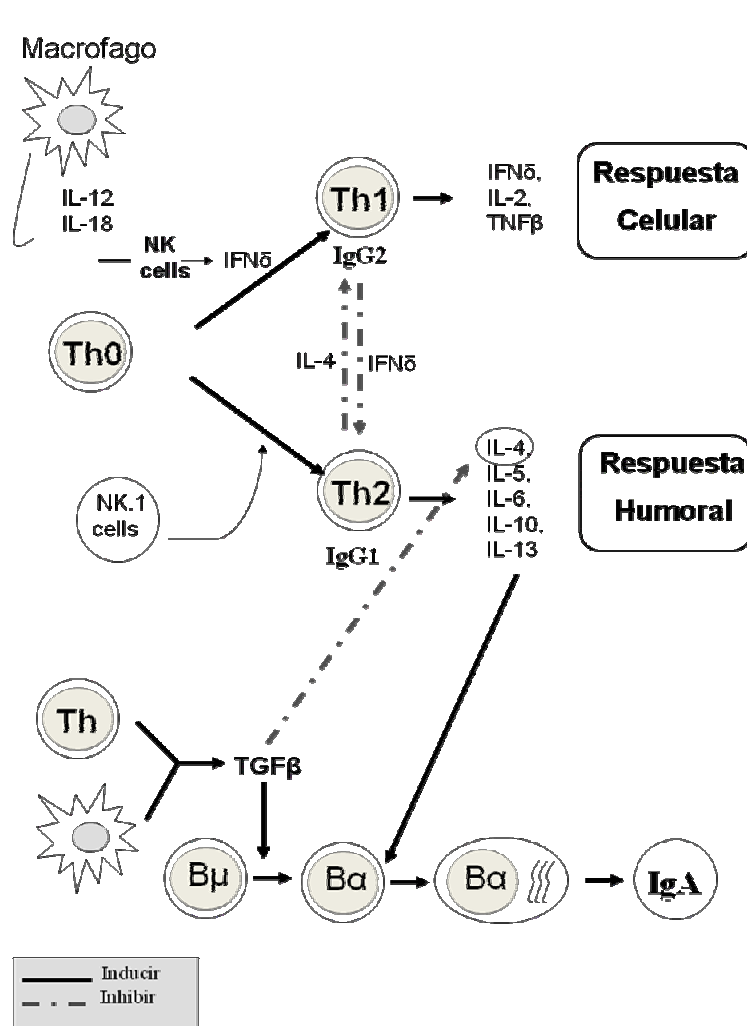


Fig. 3.2- Mecanismo de activación y regulación de la respuesta inmune Th1, Th2 y respuesta inmune en mucosas.

Los procesos de la respuesta inmune están mediados por los estímulos del patógeno o vacuna. De esta forma, se pueden activar las células presentadoras de antígeno (CPA) o los linfocitos cooperadores. La diferenciación de células Th0 a Th1 ó Th2 esta dirigida por la producción de citoquinas. La Fig. 3.2.muestra un ejemplo de la diferenciación de la respuesta inmune Th1.

Patógenos que se introducen

en el interior de los macrófagos (CPA), inducen la producción de IL-12 y / o IL-18, activando la producción de IFN- γ en células NK; de esta forma se induce a la diferenciación de la respuesta inmune Th1. Th1 comprende la respuesta celular que complementa la producción de anticuerpos, (IFN- γ , IL-2, TNF β). La respuesta inmune Th2 se observa en infecciones con parásitos o administración de vacunas, se caracteriza por la producción de citoquinas IL4, IL5, IL6, IL10 e IL-13 y esta involucrada con la respuesta humoral. La Fig. 3.2. muestra un ejemplo de diferenciación a células Th2, con la activación de células NK.1 que producen IL-4 induciendo la respuesta inmune Th2. Por otra parte la producción de IgAs requiere la producción de TGF β , que induce la diferenciación de células B a IgA.

La producción de IFN- γ se ha detectado en la respuesta inmune frente a distintos patógenos virales como VFA, PPA, Aujeszky o PRRS, donde se ha identificado su papel esencial en el control de la replicación de virus en los hospedadores (Zhang, Z y cols, 2002; Revilla y cols, 1992; Zuckermann y cols, 1996a; López-Fuertes y cols, 1999).

3.2.3- NUEVAS ESTRATEGIAS DE VACUNACIÓN

3.2.3.1- VACUNAS DIVA

En general, las vacunas deben cumplir una serie de requisitos entre los que se incluyen seguridad, eficacia, facilidad de producción y bajo coste. Pero además, las vacunas de uso veterinario deben permitir la diferenciación clara entre animales infectados y vacunados, mediante la utilización de ensayos de diagnóstico adecuados. Este requerimiento es el que se denomina con el acrónimo DIVA (Differentiating infected from vaccinated animals) (Van Oirschot J, 2001; Van Oirschot J, 2002). De hecho, existen vacunas convencionales disponibles para distintas infecciones virales de especies ganaderas, cuyo uso no está permitido por interferir con la vigilancia epidemiológica de las mismas y porque su uso implicaría la pérdida del status “país libre de enfermedad”. Un ejemplo clásico de esto es la vacunación frente al VFA con las vacunas inactivadas. Aunque este tipo de vacunas están disponibles desde hace muchos años, su uso no está permitido en países libres de fiebre aftosa (en la UE desde 1991), ya que el status sanitario del país se vería comprometido y esto implicaría importantes restricciones en el comercio internacional tanto de animales vivos como derivados (Doel. T, 2003).

El uso de vacunas DIVA permite realizar un correcto seguimiento epidemiológico de la enfermedad, aplicar medidas sanitarias adicionales como son el sacrificio de animales o la restricción al movimiento de los mismos en zonas menos extensas, lo que supone reducir costes de vacunación. Las vacunas DIVA además presentan otras ventajas, como la posibilidad de inmunizar frente a enfermedades de elevada prevalencia (Meeusen y cols, 2007).

3.2.3.2- VACUNAS DE NUEVA GENERACIÓN

a)- Vacunas basadas en virus modificados genéticamente

El conocimiento de la estructura del genoma de muchos virus así como la posibilidad de modificar dicha estructura en el laboratorio está permitiendo la obtención de cepas virales atenuadas por inactivación de genes esenciales para la Patogenia.

De este modo se han obtenido cepas del virus de Aujeszky, en las que se eliminó el gen de la glicoproteína I y/o la X, que permiten controlar esta enfermedad y diferenciar

claramente los animales infectados de los vacunados (Lehman J y cols, 1993, Meeussen y cols, 2007). Para la FA se ha explorado la utilización de virus vivos atenuados obtenidos a partir de un clon infeccioso en el que se ha deleccionado el gen que codifica la proteína L (Mason y cols, 1997). En este caso no obstante, la gran capacidad de variación y el amplio número de hospedadores naturales del virus hace, por el momento, complejo la obtención de vacunas atenuadas eficaces.

Otro abordaje para el desarrollo de este tipo de vacunas consiste en la producción de quimeras virales, en las que se combinan genomas de dos especies virales con diferentes propiedades. Con abordajes de este tipo se han comercializado ya vacunas frente al Circovirus porcino tipo I y frente al virus West Nile (Tabla 3.1).

b)- Vacunas de subunidades

La identificación en los diferentes patógenos, de epítomos potencialmente protectivos, y su expresión mediante ingeniería genética o síntesis química, permite producir y purificar grandes cantidades de antígeno a costes relativamente bajos.

Se pueden obtener proteínas recombinantes utilizando distintos sistemas biológicos, como bacterias, levaduras, plantas o empleando virus recombinantes para expresión en células de mamífero o de insecto

Las bacterias son fácilmente modificables para la síntesis eficiente de proteínas exógenas, pero son incapaces de realizar algunas de las modificaciones post-traduccionales como la glicosilación y no secretan las proteínas recombinantes, lo que dificulta su extracción. Además la inmunogenicidad de las proteínas expresadas en bacterias, en general, es baja. La proteína VP1 del VFA, contiene importantes sitios antigénicos capaces de inducir Acs neutralizantes, sin embargo, expresada en *E. coli*, ha resultado muy poco inmunogénica (Kleid y cols, 1981).

Las levaduras son también fácilmente modificables, glicosilan las proteínas, aunque con una eficiencia menor que las células eucarióticas superiores. Este sistema se ha utilizado para la producción de una vacuna frente a la proteína *core* del virus de la hepatitis B (McAleer y cols, 1984).

La expresión de antígenos virales en plantas transgénicas es otra alternativa que comenzó a ser explorada hace unos años, y que parece ofrecer resultados prometedores, como la vacuna frente a la enfermedad de Newcastle registrada en el 2005 en USA (Park y cols, 2006).

Tabla 3.1. Vacunas de nueva generación de uso veterinario comercializadas o en proceso de comercialización

Patógeno	Especie animal	Nombre Comercial	Distribuidor	Características	Clasificación de vacunas	Referencias
Pseudorabia	Cerdo	Suvaxyn Aujeszky	Fort Dodge	Genes deletados (gE y thimidina kinasas), Vacuna DIVA	Vacunas DIVA	Ferrari y cols, 2000
PCV2	Cerdo	Suvaxyn	Fort Dodge	Gen quimera PCV1-2 (inactivado); adyuvante	Vacunas de virus modificados genéticamente	Fenaux y cols, 2004
WNV	Caballo	Prevenile	Intervet	Flavivirus vivo vacuna quimera	Vacunas de virus modificados genéticamente	Monath y cols, 2001
PCV2	Cerdo	Porcillis PCV2	Intervet	Baculovirus recombinante que expresa las proteínas ORF2 / PCV2, adyuvante	Vacunas de subunidad	Blanchard y cols, 2003
Fiebre porcina clásica	Cerdo	Porcillis pesti	Intervet	Baculovirus recombinante que expresa la glicoproteína E2	Vacunas de subunidad	Van Aerle y cols, 2003
Inmuno-castración	Cerdo	GnRH vaccines	Improvac	Vacuna peptídica,	Vacuna de subunidad	Purcell y cols, 2007
New Castle	Pollo	NA	Dow agrosciences	Hematoglobulina expresada en células de plantas (registrada pero aún no está en el mercado)	Vacunas de subunidad	Park y cols 2006. Velts y cols, 2006
Rabia	Fauna silvestre y perros	Raboral	Merial	Virus recombinante	Vacunas recombinantes basadas en vectores vivos	Brochier y cols, 1991
Necrosis hematopoyética	Salmón	Apex-IHN	Novartis (aqua health)	Vacunas DNA	Vacunas basadas en DNA	Meussen y cols 2007

Datos de Meeussen y cols, 2007; Purcell y cols, 2007

Dentro de los sistemas de virus recombinantes, el virus de la nucleopolihedrosis (baculovirus), es uno de los más utilizados. Los baculovirus son virus de insecto que permite la obtención de proteínas recombinantes correctamente modificadas post-traduccionalmente con una gran eficiencia. De manera muy extendida las proteínas recombinantes así generadas pueden expresarse utilizando células de insecto (SF9, H5, etc.), o como alternativa más económica y menos laboriosa, mediante la inoculación de larvas (Perez-Filgueira y cols, 2007).

La utilización de proteínas recombinantes producidas en un sistema de baculovirus ha proporcionado resultados prometedores en inmunizaciones de animales frente a distintos patógenos como el virus de la lengua azul (Roy y cols, 1996), el parvovirus canino (López de Turiso y cols, 1992), o el virus de la peste porcina clásica (PPC) (Van Aarle, 2003, Meeussen y cols, 2007).

Otro abordaje interesante de vacunas de subunidades son las vacunas peptídicas, cuyas ventajas e inconvenientes se detallan más adelante en el punto 3.2.3.3.

La vacunación basada en VLPs, representan otro tipo particularmente efectivo de vacunas de subunidad puesto que incorporan las ventajas de la disposición repetitiva y estructurada de los antígenos, propia de las partículas virales, pero carecen de material genético infeccioso, excluyendo así los riesgos de reversión a virulencia o inactivación incompleta, asociados a las vacunas basadas en virus.

Numerosos estudios indican que las VLPs son capaces de inducir una fuerte respuesta humoral incluso en ausencia de adyuvantes (Clarke y cols, 1987; Pumpens y cols, 1995; Fehr y cols, 1998; Lechner y cols, 2002; Bachmann y Jennings, 2004). También son eficaces en la inducción de respuesta celular (Ruedl y cols, 2005), y en la activación de células presentadoras de antígeno, como las células dendríticas (Lenz y cols, 2001; Morón y cols, 2002; Gamvrellis y cols, 2004; Yang y cols, 2004) y los macrófagos (Rueda y cols, 2001; Pumpens y Grens, 2001; Bachmann y Jennings, 2004).

Ejemplos de VLPs con potencial aplicación al desarrollo de vacunas sintéticas en el campo de la salud humana incluyen: las derivadas del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HbsAg) y del virus del papiloma (Berry y Palefsky, 2003), ya en fase de pruebas clínicas o en el mercado (Bachmann y Jennings, 2004). En el campo veterinario se han obtenido resultados prometedores con VLPs derivadas del virus de la lengua azul, rotavirus y parvovirus (Noad y Roy, 2003), así como del VEHC (Plana-Duran y cols, 1996; Pérez-Filgueira y cols, 2007).

c)- Vacunas recombinantes replicantes basadas en vectores vivos

La utilización de vectores vivos presenta algunas ventajas importantes, como son: una dosis inicial de antígeno requerida baja, la posibilidad de inducir respuesta tanto humoral como citotóxica y una prolongación del período de exposición al antígeno. En los últimos años se han utilizado diversas aproximaciones experimentales para la obtención de vacunas recombinantes frente a varios virus. Vectores procariotas como *E. Coli* o *Salmonella typhimurium*, se han utilizado para expresar proteínas del virus de la gripe y de la gastroenteritis transmisible porcina con buenos resultados, aunque aún quedan por resolver problemas asociados a la estabilidad de las bacterias recombinantes una vez administradas a los animales.

Poxvirus como vaccinia, fowlpox, canarypox y myxoma se han utilizado como vectores de genes exógenos de diferentes virus, desde que comenzaron a principios de los 80, a ser propuestos como vehículos para la administración de antígenos. Otros vectores virales basados en el empleo de adenovirus (Torres y cols, 1995; Grubman, M, 2005), o herpesvirus (Jenings R, 1998; Macnab S y cols, 2008); también han sido utilizados con éxito para inmunizar animales frente a patógenos virales de interés en Sanidad animal.

Sin embargo, este tipo de vacunas presenta como principal inconveniente su seguridad, su utilización supone la liberación al medio de organismos modificados genéticamente, lo que supone graves problemas en su aprobación por parte de las autoridades competentes.

d)- Vacunas basadas en DNA-RNA

Esta estrategia consiste en administrar fragmentos de ácidos nucleicos capaces de expresar proteínas de agentes patógenos, como inmunógenos. Este tipo de vacunación evita los problemas asociados con algunos vectores vivos en lo referente a cuestiones de seguridad y permite la activación de la respuesta citotóxica, una vez los antígenos son expresados intracelularmente.

Dado que la inmunización de grandes animales no ha resultado tan eficiente como la observada en el modelo de ratón, en la actualidad se han desarrollado diferentes estrategias que permiten incrementar el potencial inmunogénico de las mismas, como incorporar secuencias CpG (Van Ginkel y cols, 2000; Lavelle y cols, 2005), o señales capaces de dirigir los antígenos a una determinada ruta de presentación antigénica (Brewer J y cols, 1997; Whitton. J y cols, 2004) o la electroporación *in vivo* del DNA (Meeussen y cols, 2007).

3.2.3.3- VACUNAS PEPTÍDICAS

Para aquellos sistemas virales en los que se dispone de información precisa sobre la localización de los sitios antigénicos, es posible abordar la construcción de vacunas basadas en la utilización de péptidos sintéticos correspondientes a dichos sitios (Atassi y Webster, 1983). Las vacunas basadas en la utilización de péptidos sintéticos como inmunógenos presentan una serie de ventajas adicionales a las compartidas con otras vacunas de subunidades; son fáciles de almacenar, transportar y distribuir, ya que se pueden conservar liofilizadas, sin necesidad de mantener una cadena de frío para su conservación. Su caracterización y el análisis de su pureza es sencillo y puede realizarse mediante ensayos bien establecidos que facilitan el control de calidad del producto final y por tanto su aprobación por parte de las autoridades competentes en esta materia. Es posible diseñar vacunas peptídicas múltiples, frente a diferentes patógenos o incluir en la formulación diferentes epítomos de un mismo patógeno, una de las estrategias usadas para superar restricciones debidas al MHC (Purcell A y cols, 2007). La simplicidad para producir péptidos permite realizar cambios en el diseño de las vacunas peptídicas de manera que la formulación de las mismas se adapte rápidamente a la aparición de nuevas variantes virales, lo que es de gran interés para virus como el de la FA o la Influenza. Además, la síntesis de péptidos supone una alternativa a la producción de determinadas proteínas que son difíciles de obtener por métodos recombinantes, debido a su inherente toxicidad para bacterias o virus (Van der Burg S. y cols, 2006).

Algunos de los principales inconvenientes de las vacunas peptídicas como su baja inmunogenicidad o su corta estabilidad *in vivo*, están siendo resueltos en la actualidad mediante distintas estrategias, como la incorporación a las secuencias peptídicas de lípidos, grupos fosfatos o carbohidratos, o la síntesis de estructuras dendriméricas (Ben Yedidia, y Arnon. R, 1997; Lee. C y cols, 2005).

3.3- EL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

3.3.1- LA ENFERMEDAD

El VFA fue el primer virus animal descrito al ser identificado como un agente filtrable, más pequeño que las bacterias, responsable de la aparición de la FA (Loeffler y Frosch,

1897). La FA afecta fundamentalmente a ganado porcino y bovino, aunque también a ovino, caprino y a más de 30 especies de artiodáctilos silvestres (Forman y Gibs, 1974; Pereira, 1981). Es una enfermedad muy contagiosa cuya transmisión puede llevarse a cabo por contacto directo, transporte mecánico, aerosoles, etc. El virus penetra por los epitelios de la boca, nariz, laringe o zonas de piel desgarrada, donde produce vesículas o aftas primarias. A los tres o cuatro días comienza la fase de viremia febril en la que el virus se detecta en sangre y alcanza epitelios alejados del punto de entrada, donde produce aftas secundarias (paladar, lengua, hocico, pezuñas). En animales jóvenes se puede producir miocarditis, lo que puede elevar la tasa de mortalidad hasta el 50%, mientras que en adultos, la mortalidad no sobrepasa el 5%. Tras la fase aguda de la enfermedad, los animales se recuperan. En bovinos, algunos individuos pueden desarrollar una infección persistente, convirtiéndose en portadores asintomáticos (van Bakkum y cols, 1959; Salt, 1993). Estos individuos son potenciales reservorios de virus que pueden originar nuevos brotes de enfermedad aguda (para una revisión de la enfermedad, véase Timoney y cols, 1988; Domingo y cols, 1990; Suttmoller P, y cols, 2003, Kitching P y cols, 2007).

La gran importancia económica de la FA viene determinada fundamentalmente por las pérdidas de producción que causa durante largos periodos de tiempo, fundamentalmente en la industria lechera y de carne porcina, además de por ser una de las principales causas de restricción en el comercio internacional tanto de animales vivos como de productos derivados (Doel, T, 2003; Kitching, P y cols, 2007). La aparición de la FA además causa pérdidas derivadas del gasto de vacunación y sacrificio de animales, y tiene un fuerte impacto social y medioambiental, que puede llegar a afectar a otros sectores de la economía como es el turismo. La epidemia de FA sufrida por Taiwan en 1997 supuso pérdidas de cuatro billones de dólares, en un 90% correspondientes a restricciones en la exportación. En 2001 Holanda tuvo que sacrificar 200.000 animales vacunados frente al VFA (Pluimers F y cols, 2004) y la pérdidas económicas sufridas por Gran Bretaña durante los brotes de ese mismo año, se estimaron en cerca de los 8 billones de dólares (Thompson D y cols, 2002).

3.3.2- CONTROL DE LA ENFERMEDAD

En Europa, la FA se presentaba como panzootias cíclicas cada 6 a 12 años, dejando algunos focos enzoóticos. A mediados de los años 60 se inició una política sistemática

de vacunación y control que redujo drásticamente el número de brotes, dejando Europa Occidental prácticamente libre de la enfermedad. La vacuna que se utilizó entonces, y que se sigue empleando en las zonas donde aun es endémica, está producida a partir de virus inactivados químicamente, concentrados y purificados por cromatografía (Frenkel, 1951; Mowat y cols, 1962; Van Bekkum y cols, 1967; Doel. T, 2003). La inmunidad con este tipo de vacunas es específica de serotipo, raramente supera los 6 meses de duración, y no induce inmunidad esterilizante, por lo que animales vacunados (rumiantes) y expuestos al virus pueden llegar a ser portadores subclínicos de la infección (Doel. T, 1996; Doel. T, 2003; Kitching P y cols, 2007). La protección frente a cepas antigénicamente diferentes es aún más corta de 6 meses, pudiendo ser incluso insuficiente si la diferencia antigénica es grande. El coste de estas vacunas es alto, ya que deben producirse en cultivo de tejidos en laboratorios de alta seguridad biológica y para su conservación requieren del mantenimiento de una cadena de frío en un rango entre 2-8°C.

Todos estos factores dificultan el adecuado empleo de estas vacunas en aquellas zonas donde la FA aun es endémica, que en general corresponden a regiones poco desarrolladas (Figura 3.3).

En 1992 la Unión Europea (UE) decidió suspender las campañas de vacunación tras comprobar que el número de brotes producidos en los últimos años había disminuido drásticamente y que la mayoría de ellos tenían como causa el empleo de vacunas inactivadas inadecuadamente ó escapes de virus de plantas de producción de vacunas (Beck y Strohmaier, 1987; Carrillo y cols, 1990). Esta política de no vacunación generó una numerosa población ganadera susceptible al VFA, lo que unido a un incremento en el número de intercambios comerciales internacionales y al movimiento de personas (legal o ilegalmente), ha incrementado el riesgo de introducción de la FA en Europa.

Después de 1992, en el continente europeo se declararon brotes de FA en Italia (1993), Grecia (1994 y 1996), Bulgaria (1994), Albania (1996), Macedonia (1996), Yugoslavia (1996), Tracia (1995) y en algunos próximos como Argelia y Marruecos (1999). El riesgo de introducción de la enfermedad en la UE sigue vigente y se puso de manifiesto con los brotes del 2001 en Gran Bretaña y Holanda, o los del 2007 en Chipre, donde desde 1964 no se había declarado ningún brote de FA.

El control de la FA en el 2001 en la UE, abrió el debate sobre cuales eran las mejores estrategias para detener la infección. En Gran Bretaña se aplicó una política de sacrificio, que supuso eliminar alrededor de 8 millones de animales. Los costes de esta

estrategia fueron muy elevados, tanto desde el punto de vista económico, como en términos de bienestar animal y humano (Sutmoller P y cols, 2003).

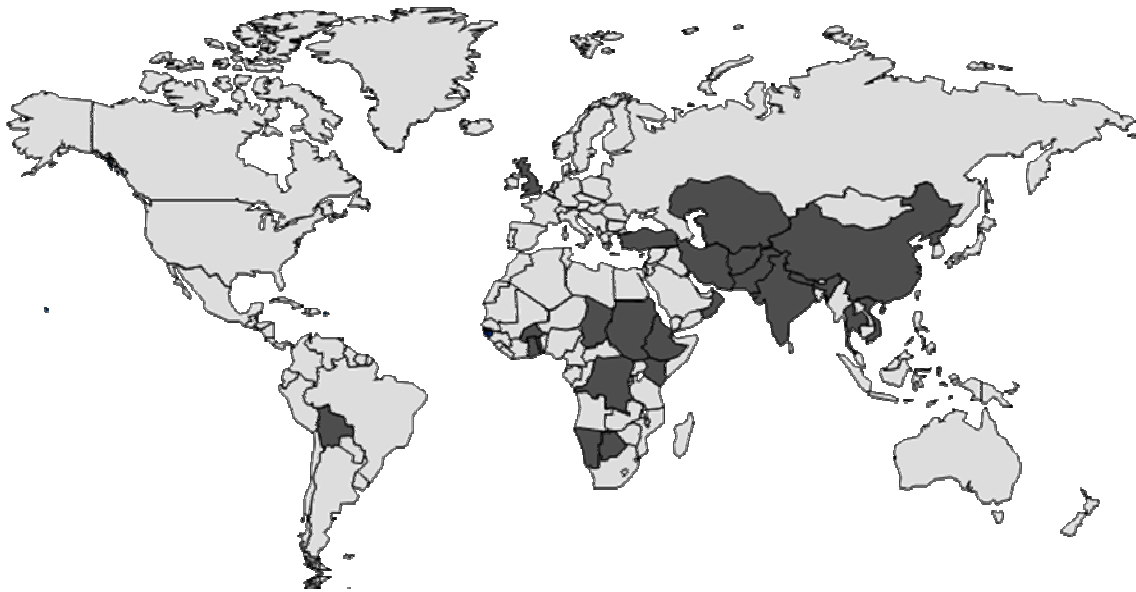


Fig. 3.3- Distribución mundial de la enfermedad de la Fiebre Aftosa en el 2007, según la OIE. Países que han declarado la enfermedad de la Fiebre Aftosa durante el año 2007.

En Holanda sin embargo se adoptó la política de sacrificio junto con la aplicación de vacunación en anillo. Aunque esto permitió controlar la infección mucho más rápidamente que en Gran Bretaña, el sacrificio de los animales vacunados aparentemente sanos, como medida para evitar la aparición de portadores, no estuvo exenta de polémica y en definitiva supuso el sacrificio de 270.000 animales en todo el país (Sutmoller P y cols, 2003).

Estos datos en definitiva, remarcan la necesidad de diseñar y desarrollar nuevas estrategias de control de la FA, que contribuyan a minimizar los daños económicos y sociales que suponen la aparición de esta enfermedad.

3.3.3- EL VIRUS

El VFA constituye el género Aftovirus dentro de la familia *Picornaviridae*. La partícula infectiva, de unos 28 nm de diámetro y carente de envoltura, contiene un RNA de cadena sencilla y polaridad positiva rodeado de una cápsida proteica. La simetría de esta cápsida es icosaédrica y esta formada por 60 capsómeros integrados por cada una de las cuatro proteínas estructurales: VP1, VP2, VP3 y VP4 (Rueckert, 1990) (Figura. 3.4). Los pesos moleculares son de 23,2; 24,6 y 24,2 kDa para la VP1, VP2 y VP3,

respectivamente (Boothroyd y cols, 1982) y 8.5 kDa para la VP4 (Carroll y cols, 1984). Los viriones del VFA poseen un coeficiente de sedimentación de 146 S, y una densidad de flotación en CsCl de 1,43-1,45 g/cm³. El VFA es muy lábil a pH ligeramente ácidos, disociándose el virión en partículas con un coeficiente de sedimentación 12S a pH < 6.5 (Bachrah, 1981).

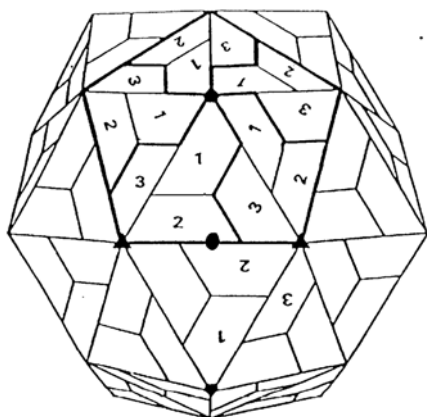


Fig. 3.4- Esquema general de la cápsida del VFA y otros picornavirus.

Se indica la localización de las proteínas VP1, VP2 y VP3, indicadas como 1, 2 y 3 respectivamente. Los ejes de simetría de orden 5, 3 y 2 están representados por un pentágono, un triángulo y una elipse, respectivamente (Tomado de Harrison, 1989).

El VFA presenta una gran diversidad antigénica, reflejada en la existencia de 7 serótipos: A, O, C (los más ampliamente distribuidos), Asia 1, SAT1, SAT2, SAT3, y más de 60 subtipos (Pereira, 1981).

La estructura tridimensional de viriones de aislados del VFA serotipo O (O1 BFS; Acharya y cols, 1989) C (C-S8c1; Lea y cols, 1994), ha sido resuelta mediante técnicas de cristalografía, lo que ha permitido conocer en detalle los residuos expuestos en la superficie de la partícula vírica y su estructura (revisión en Matéu, 1995).

El RNA vírico, de unos 8450 nt (Carroll y cols, 1984) contiene una única fase de lectura abierta, flanqueada por dos regiones no codificantes. En su extremo 3' hay un tramo de poliadenina (poli A) de unos 60 a 80 nt codificados por el virus. El extremo 5' se encuentra unido covalentemente a la proteína vírica VPg, y presenta un tramo de policitidina (poliC) de entre 100 y 300 residuos, localizado a unos 400 nt del extremo 5' y a unos 700 del primer AUG iniciador. Los 450 nt inmediatamente anteriores a este primer AUG poseen una estructura secundaria bien definida y conservada que se denomina IRES (sitio interno de entrada de ribosoma), implicado en la iniciación de la traducción (Ehrenfeld, 1996).

El RNA vírico se traduce mediante un mecanismo que independiente de la estructura cap (de la que carece), dando lugar a una única poliproteína, que tras ser procesada proteolíticamente, da lugar a las proteínas maduras (Figura 3.5).

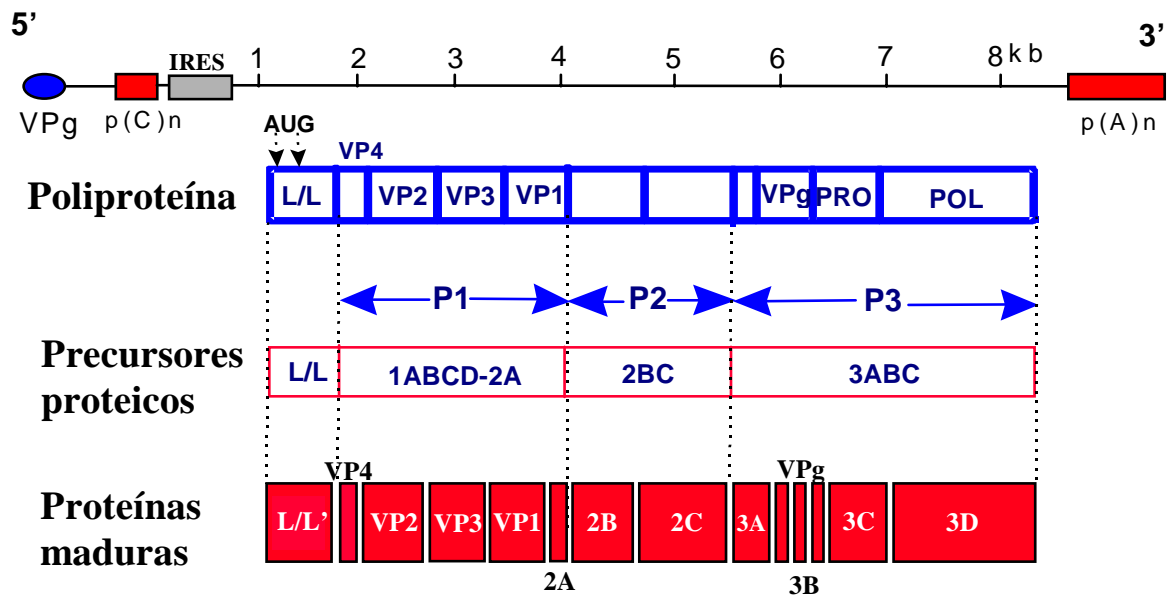


Fig.3.5- Estructura del genoma del VFA y las proteínas que codifica.

Desde un punto de vista poblacional, el genoma del VFA es una cuasiespecie (Eigen y Schuster, 1977; Domingo y cols, 1985; Domingo y cols, 2003, Domingo y cols, 2004). Esto implica que sus poblaciones están constituidas por múltiples variantes muy relacionadas que se encuentran en un equilibrio dinámico entre la frecuencia con la que surgen y su capacidad para multiplicarse, fitness, en determinadas condiciones ambientales (Domingo y Holland, 1997). Esta propiedad proporciona al virus un gran potencial para la variación y adaptación a las diferentes presiones selectivas (Domingo y Holland, 1994).

3.3.4- RESPUESTA INMUNE FRENTE AL VFA

Para los picornavirus la respuesta humoral parece tener un papel principal y el VFA no es un caso excepcional. La inducción de Acs neutralizantes frente al virus en animales susceptibles ha sido el mecanismo más estudiado, mientras que la información disponible sobre el papel de los linfocitos T citotóxicos en protección es muy limitada (McCullough y cols, 1992; McCullough y Sobrino, 2004).

3.3.4.1.-RESPUESTA HUMORAL

Los Acs circulantes juegan un papel importante en la protección *in vivo* frente a la infección, existiendo en general, una buena correlación entre niveles altos de Acs

neutralizantes en suero y protección frente a la infección (van Bekkum y cols, 1969; McCullough y cols, 1992). Sin embargo no siempre este tipo de respuesta garantiza protección clínica (van Maanen y Terpstra, 1989; Melen y Barteling, 1986; Ahl y cols, 1990).

Los Acs neutralizantes se dirigen frente a un número discreto de sitios antigénicos localizados en la superficie de la partícula viral. En concreto el bucle G-H de VP1, entre las posiciones [140-160], constituye para el VFA de serotipo C, el llamado sitio antigénico A (Logan y cols, 1993; Matéu, 1995). Esta región de secuencia hipervariable, interviene en la estructura tanto de epítomos B continuos como discontinuos y contiene el tripeptido RGD (arginina-glicina-aspartico) muy conservado entre serótipos (Martínez y cols, 1997) e implicado en la unión al receptor celular (Fox y cols, 1989; Logan y cols, 1993; Mason y cols, 1997).

Las inmunoglobulinas de isotipo IgM, son los primeros Acs neutralizantes detectables en suero a los 3 - 4 días post-infección o post-vacunación. Aunque las IgM específicas generalmente no persisten, en cerdos infectados con el VFA se han seguido detectando hasta 6 meses después de la infección (Cowan, 1973). Días más tarde aparecen en suero las IgGs, que se convierten en la fracción dominante a los 21 días post vacunación. No está claro si los isotipos IgG1 e IgG2 tienen diferente capacidad protectora frente al VFA, pero algunos autores han correlacionado títulos elevados de IgG1 con protección, al ser mayor la producción de este isotipo en animales infectados o vacunados con virus inactivado, que con algunas vacunas peptídicas que solo han proporcionado bajos niveles de protección (Mulcalhy y cols, 1990).

Se conoce muy poco acerca de los mecanismos inmunes inespecíficos o específicos (IgA) de la barrera defensiva en las mucosas del tracto nasofaríngeo, donde se inicia la infección por el VFA *in vivo*. La respuesta en mucosas frente al VFA en cerdo presenta una clara diferencia con la desarrollada en vacas; los títulos de Acs neutralizantes presentes en muestras nasales de cerdos infectados, son similares a los determinados en suero (Francis y Black, 1983). Esto parece sugerir que en el cerdo, la inmunidad de mucosas tiene un papel más relevante en protección (Doel. T, 2005).

En cerdos vacunados convencionalmente sin embargo, los títulos de Acs neutralizantes en muestras nasales son inferiores (títulos < 2 log), a los detectados en suero (Francis y Black, 1983).

En cuanto al isotipo de los Acs presentes en muestras de mucosas, en animales vacunados el isotipo mayoritario es IgM e IgG, pero no se encuentran IgAs en ningún

momento, lo que contrasta con los datos obtenidos en animales infectados con VFA (Doel, T, 2005). Diversos estudios demuestran que solo aplicando múltiples dosis de vacuna convencional o una dosis de vacuna de alta potencia (con entre 4 y 6 veces más dosis de virus inactivado que la vacuna convencional), es posible inducir IgAs específicas a nivel local (Garland y cols, 1974; Gibson y cols, 1984; Eble y cols, 2007). Los Acs del suero de animales infectados reconocen mayoritariamente la proteína VP1, en menor grado VP2 y VP3, no reconociendo prácticamente VP4, ya que se trata de una proteína que no se encuentra expuesta en la superficie del virión.

La elevada heterogeneidad antigénica del VFA, consecuencia de la estructura de cuasiespecie de sus poblaciones, supone un serio inconveniente para el diagnóstico y control de la misma por vacunación (Domingo y cols, 1990). Esto es debido a la presencia de variantes antigénicos en sus poblaciones que pueden ser seleccionados positivamente como respuesta a la presión inmune (Feigelstock y cols, 1996).

3.3.4.2- RESPUESTA CELULAR

Estudios realizados en ratón (Collen y cols, 1989; Francis y cols, 1987), vaca (Collen y cols, 1991) y cerdo (Rodríguez y cols, 1994) indican que la respuesta frente a VFA es T dependiente y está restringida por moléculas del MHC (García-Briones cols, 2000; Glass cols, 1991). En ratón se ha demostrado que epítopos B incapaces de producir anticuerpos cuando se inmunizaba con ellos en forma aislada, eran capaces de inducirlos si se suministraban unidos a epítopos T heterólogos, no específicos del VFA (Francis y cols, 1987).

En contraste con la respuesta humoral, que es específica para cada serotipo, la respuesta celular es, en buena medida, heterotípica (Collen y Doel, 1990; Saiz y cols, 1992; Blanco cols, 2001); es decir, linfocitos de animales inmunizados con virus de un serotipo son capaces de proliferar al ser estimulados con virus de serotipo distinto. Esta respuesta heterotípica también se ha encontrado al producir *in vitro* clones de linfocitos T bovinos, un alto porcentaje de los cuales responde frente a distintos serotipos del VFA (Van Lierop y cols, 1992).

Epítopos T cooperadores, con secuencia conservada entre diferentes serotipos del VFA y reconocidos por un amplio número de animales, lo que los hace idóneos para ser incluidos en la formulación de vacunas de subunidades, se han identificado en las proteínas no estructurales 3D (Collen y cols, 1998; García-Briones y cols, 2004) 3A, 3B

y 3C (Blanco y cols, 2001) y en la proteína estructural VP4 (Van Lierop y cols, 1995; Blanco y cols, 2000). La síntesis de uno de estos epítomos T, localizado entre las posiciones [20-34] de la proteína 3A (Blanco y cols, 2001), en forma de tándem con el epítomo B correspondiente al sitio A (VP1 [140-160]), fue capaz de estimular *in vitro* la respuesta linfoproliferativa de CMSP de cerdos infectados con el VFA. Este péptido tándem TB fue además capaz de inducir en esta estimulación *in vitro*, actividad neutralizante específica, lo que demostró su capacidad para activar una respuesta cooperadora entre linfocitos T y B. Por ello, dado el potencial de dicho epítomo T de 3A, para mejorar la inmunogenicidad de nuevas vacunas frente al VFA, en el desarrollo de esta Tesis se ha utilizado como inmunógeno en las diferentes estrategias vacúnales diseñadas.

Dejando a un lado la necesidad de la respuesta T cooperadora para obtener una inmunidad humoral adecuada, la importancia de la respuesta celular en la protección frente al VFA ha sido poco estudiada. La respuesta citotóxica constituye un mecanismo importante en la defensa del hospedador frente a infecciones virales agudas, crónicas o persistentes, incluyendo las causadas por picornavirus (Usherwood y cols, 1995). Sin embargo, se sabe poco sobre la contribución de este tipo de respuesta a la protección frente al VFA (Sobrino y cols, 2002). Se ha demostrado que la actividad de los linfocitos T citotóxicos limita la replicación viral, ayuda a la eliminación del virus del organismo e induce la producción de citoquinas con actividad antiviral como el IFN- γ (Emile y cols, 1990). En el caso del VFA, se ha sugerido la implicación de las células *natural killer* en la respuesta inmune protectora aunque no se ha podido correlacionar esta activación con la eliminación de virus *in vivo* (Amadori y cols, 1992.). Evidencias indirectas como que anticuerpos monoclonales anti-CD8⁺ o anti-MHC-II inhiban la respuesta linfoproliferativa de CMSP de cerdos inmunes (Childerston y cols, 1999; Saiz y cols, 1992; Blanco cols, 2000, 2001), o que determinadas vacunas sean capaces de conferir protección en ausencia de actividad neutralizante significativa (Beard y cols, 1999; Sanz-Parra y cols, 1999; Borrego y cols, 2006) sugieren un posible papel de los linfocitos CD8⁺ en protección.

4. OBJETIVOS

El principal objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido el desarrollo de vacunas sintéticas frente al VFA, capaces de superar los principales inconvenientes que presentan las actuales vacunas en uso.

Como estrategia de vacunación hemos seleccionado las vacunas basadas en péptidos sintéticos, ya que presentan ventajas adicionales a las compartidas con otras vacunas de subunidades. Entre ellas cabe destacar su fácil almacenamiento, transporte y distribución, sin necesidad de mantener la cadena del frío, su fácil análisis y caracterización, lo que permite el control de calidad y pureza de la vacuna de forma sencilla y además facilita su aprobación por las autoridades reguladoras .

Con objeto de obtener resultados de interés práctico, las estrategias de control diseñadas en esta Tesis se han evaluado en un importante hospedador natural del VFA, el cerdo.

Los objetivos específicos de esta Tesis han sido:

- 1.-** Evaluación de la respuesta inmune inducida por péptidos sintéticos lineales que incluyen en su formulación epítomos B y/o T del VFA.
- 2.-** Análisis de la protección inducida por los péptidos lineales mencionados en el objetivo 1, tras el desafío con el VFA
- 3.-** Diseño de un péptido ramificado (péptido dendrimérico) presentando epítomos B y T del VFA.
- 4.-** Evaluación de la respuesta inmune inducida por el péptido dendrimérico diseñado en el objetivo anterior.
- 5.-** Análisis de la protección inducida por el péptido dendrimérico diseñado en el objetivo 3, tras el desafío con el VFA.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1- MATERIALES

5.1.1- CÉLULAS

Células BHK 21, de riñón de hámster, suministradas por “American Type Culture Collection” (ATTC), se utilizaron para la propagación y titulación del VFA.

5.1.2- VIRUS

En esta tesis se ha utilizado el aislado viral de VFA de serotipo C, C1 Santa Pau Sp / 70 (C-S8), tanto para la inoculación de animales como para la realización de los ensayos de seroneutralización y ELISAS.

5.1.3- PÉPTIDOS SINTÉTICOS

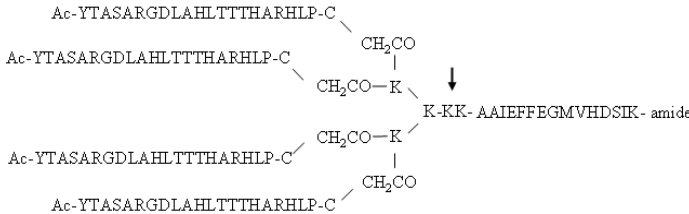
Los péptidos utilizados en esta Tesis (Tabla 5.1) fueron sintetizados en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Barcelona, por el grupo del Dr. D. Andréu, utilizando para ello una modificación del método de síntesis en fase sólida (Giralt y cols, 1981).

La secuencia empleada para la síntesis de los péptidos correspondió a la determinada para el aislado del VFA de serotipo C, C-S8 (Toja y cols, 1997). Se sintetizaron dos tipos de péptidos: lineales y dendriméricos. Los péptidos B, TB y el dendrímero B₄T se utilizaron como inmunogenos y como antígenos en la estimulación de CMSP. El péptido T se utilizó sólo en las estimulación *in vitro* de estas células.

5.1.4- ANIMALES

En esta Tesis se han utilizado en total 24 cerdos Landrance x Large White de 2 meses y medio de edad aproximadamente.

Tabla 5.1. Péptidos sintéticos utilizados en esta Tesis

Peptido	Posición en VFA	Secuencia
B	VP1 [136-154]	YTASARGDLAHLTTTHARHLP-amide
T	3A [21-35]	AAIEFFEGMVHDSIK- amide
TB	3A [21-35] VP1 [136-154]	AAIEFFEGMVHDSIKYTASARGDLAHLTTTHARHLP-amide
B₄T*	VP1 [136-154] 3A [21-35]	

* La flecha indica un sitio posible de corte para la catepsina D.

5.1.5- ELISAS

* **Sueros Conjugados**

- Proteína A marcada con HRPO, suministrada por Pierce (Ref. 32400). Se utilizo para la detección de inmunoglobulinas porcinas mediante ELISA.
- Anticuerpos monoclonales anti-isotipo porcino: Anti-IgG1 porcino (Ref. MCA 635), Anti- IgG2 porcino (MCA 636) y anti-IgA (Ref. MCA 638). Todos suministrados por Serotec. Se utilizaron para la determinación del isótipo de los anticuerpos anti-VFA porcinos.

* **Sueros no conjugados**

- Suero de conejo hiperinmune anti-VFA de serotipo C, suministrado por el Institute of Animal Health (IAH) de Pirbright (Gran Bretaña). Se empleo para la detección de anticuerpos frente a VFA mediante ELISA.

*** Antígenos**

- Proteína recombinante 3ABC (Blanco y cols, 2002), utilizada como antígeno en el ELISA utilizado para valorar la seroconversión a esta proteína no estructural del VFA, en los sueros porcinos.
- Sobrenadantes de cultivos celulares (células BHK21) infectadas con el VFA C-S8, se utilizaron para el análisis de anticuerpos anti-VFA en sueros porcinos.

*** Sustratos**

- O-Phenylenediamine, suministrado por Sigma (Ref. P-1063 Lot. 31K8202). Se utilizó como sustrato en los ELISAS de detección de anticuerpos frente al VFA.
- TMB, suministrado por la casa Biosource (Ref. Sb-2-1). Se empleó como sustrato en los ELISAS para la detección de citoquinas porcinas (IL-10 e IFN- γ).

*** Kits comerciales**

- Determinación IFN- γ porcino, suministrado por la casa Pierce (Ref. 1858049-1858050).
- Determinación IL-10 porcina, suministrado por Biosource (Ref. CSC0104).

5.1.6- ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

*** Extracción del RNA**

- Tri Reagent, suministrado por Sigma (Ref. T9424).
- Cloroformo 99%, suministrados por Sigma (Ref. C2432).
- Etanol, suministrado por Merck (Ref. 1.00983.1000), se utilizó para la precipitación y lavado del RNA.
- Isopropanol, suministrado por Merck (Ref. 1.09634.1000), se empleó para la precipitación y lavado del RNA.

*** Obtención, amplificación y análisis del cDNA (RT-PCR)**

- Polimerasa Ampli Taq Gold, suministrada por Roche (Ref. N808-0243).
- Inhibidor de Rnasa, suministrada por Roche (Ref. N808-0019).
- Transcriptasa reversa MuLV, suministrada por Roche (Ref. N808-0018).
- Nucleótidos, suministrados por Roche (Ref. 1581295).

- Agarosa D-1 Medium EEOO, suministrada por Pronadisa (Ref. 8021), se utilizó para el análisis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.
- Colorante para geles de agarosa: 0.28% de azul bromofenol, 0.25% de xilen cianol, 30 de glicerol en agua destilada.
- Bromuro de etidio 1µg / ml, suministrado por Merck (Ref. 1.10608.0030), se empleó para marcar el DNA amplificado y visualizarlo en los geles de agarosa, en el transiluminador de luz uv.

Para la amplificación de cDNA se utilizó una pareja de oligos (sense y anti-sense) (Saiz M y cols, 2003):

- a) (5'-CACACGGCGTTTCACCCA(A / T)CGC-3')
- b) (5'-(GACAAAGGTTTTGTTCTTGGTC-3')

El termociclador modelo GeneAmp PCR System 2400 de Perkin Elmer (Foster City, Alemania), fue utilizado para realizar las reacciones RT-PCR.

5.1.7- MEDIOS DE CULTIVO Y SUPLEMENTOS

*** Medio Eagle modificado por Dulbecco (Bio-Whittaker Ref. BE12-614F)**

Este medio (Dulbecco y Freeman, 1959) se utilizó para el crecimiento y mantenimiento de las células BHK21. Para ello, se suplementó con un 5-10% de suero fetal bovino, glutamina 2mM, Penicilina-estreptomicina 10.000 U / ml y aminoácidos no esenciales 1X.

*** Medio RPMI (Bio-Whittaker, Ref. BE12-617)**

Este medio se utilizó para el mantenimiento de las CMSP. Para ello, se suplementó con un 5-10% de suero fetal bovino (previamente descomplementado tras su incubación durante 30 minutos a 56°C), con glutamina 2mM, con Penicilina-estreptomicina 10.000 U / ml, con β-mercaptoetanol (50 µM) y con Hepes (1M).

*** Suero fetal bovino (Bio-Whittaker Ref. DE14-801F).**

*** Glutamina 200mM (Bio-Whittaker Ref. BE17-60SE).**

*** Penicilina / Estreptomicina 10.000U / ml (Bio-Whittaker Ref. DE17-602E).**

- * **Aminoácidos no esenciales 100X** (Bio-Whittaker Ref. BE13-114E).
- * **Tripsina** (Gibco Ref. 25300-062).
- * **β -Mercaptoetanol** (Gibco Ref. 313350-010).
- * **HEPES** (Sigma Ref. H0887).

5.1.8- ISÓTOPOS RADIATIVOS Y MITOGÉENOS

* **Thimidina tritiada [^3H]-T (5mCi / ml)**, fue suministrada por Amershan Biosciences (Ref. TRK 758), se empleo para marcar el DNA celular en los ensayos de linfoproliferación.

* **Concanavalina A, (500mg)**, suministrada por Amershan Bioscience (Ref. 17-0450-01), se empleo como mitogéno en ensayos de linfoproliferación.

5.1.9- MATERIAL DE PLÁSTICO Y VIDRIO

* Placas estériles de 96, 24 o 6 pocillos de fondo plano suministradas por Nunc (Ref. NUCLONTM "Surface", 475094; Ref. 150229 y Ref. 146485 respectivamente). Se utilizaron en la generación de stocks virales, en su titulación y en la realización de los ensayos de linfoproliferación.

* Material plástico estéril de distintos tamaños (B75, B150) de (NUCLONTM "Surface", Nunc), se utilizaron para la producción de stocks del preparado del VFA.

* Placas de 96 pocillos Polysorp (Ref. 475094) y Maxisorp (Ref. 442404), suministradas por Nunc, se emplearon en los ensayos de ELISA.

5.1.10- TAMPONES, MEZCLAS DE REACCIÓN Y SUSTRATOS

* **Obtención CMSP porcinas**

- **EDTA 200mM** suministrado por Fluka, (Ref. 03609), diluidos en PBS (pH 7.2), se utilizo como solución anticoagulante.

- **Ficoll Paque** (500ml), suministrada por Amershan-Biosciences (Ref. 171440-03), se utilizo como solución separadora de linfocitos.
- **PBS**: 1.4 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 8 Mm.
- **PBS A**: PBS, 0.03% EDTA (pH 7.2).
- **H₂O**: Se utilizo para lisar los eritrocitos.

*** ELISA**

- **Tampón carbonato / bicarbonato**: 15 mM CO_3Na_2 y 35 mM CO_3HNa , (pH 9.6), utilizado para tapizar antígenos en ensayos de ELISA para detectar anticuerpos frente al VFA.
- **Solución de bloqueo**: PBS con 5% leche desnatada (p / v).
- **Solución de conjugado**: PBS en 0.1% tween-20 y 5% (p / v) leche desnatada.
- **Tampón citrato fosfato**: 25 mM $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ y 50 mM Na_2HPO_4 , (pH 5); utilizado en preparacion de OPD.
- **Sustrato de la peroxidasa** (ELISA): 4 mg / ml OPD, 0.08% H_2O_2 (30%) en 0.05 M tampón citrato-fosfato.
- **Ácido sulfúrico**, suministrado por Merck (Ref. K29161131), se empleo a una concentración de 1.8N y 3N, como solución de frenado del sustrato TMB y OPD respectivamente.

5.1.11- OTROS

- **Formaldehído**, suministrado por Sigma (Ref. F1635), utilizado en la fijación de células (BHK-21) para titulación del VFA.
- **Adyuvante completo de Freund** (Sigma Ref. F-5881).
- **Adyuvante incompleto de Freund** (Gibco Ref. 1468).

5.2.- MÉTODOS

5.2.1- CÉLULAS

5.2.1.1- CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES

Las células BHK21 se mantuvieron utilizando los medios descritos en el apartado 5.1.7. Los cultivos se incubaron a 37°C, en un ambiente con 98% de humedad, 5% de CO₂. Las células se mantuvieron en placas de plástico hasta que formaron monocapas confluentes.

5.2.1.2- OBTENCIÓN DE CMSP PORCINAS

Se recogió sangre periférica de cerdos inmunizados y / o infectados en solución anticoagulante de EDTA (200 mM), y se empleó inmediatamente para la obtención de las CMSP. Esta sangre se centrifugó a 800 x g durante 25 minutos a temperatura ambiente, recogándose la capa de células blancas que se diluyeron 1:2 en PBS-A y se depositaron sobre un colchón de la solución separadora de linfocitos (Ficoll Paque). Tras centrifugar 25 minutos a 1000 x g, se recogieron las CMSP de la interfase y se diluyeron 1:10 en PBS-A frío. Los eritrocitos contaminantes se eliminaron incubando 30 segundos con H₂O estéril e inmediatamente después reponiendo la isotonicidad de la solución final añadiendo un volumen adecuado de PBS 10 X. Las CMSP se lavaron tres veces con PBS-A, se centrifugaron a 250 x g durante 15 minutos y se resuspendieron en medio RPMI 1640 completo, en una concentración de 3×10^6 células / ml.

5.2.2- PRODUCCIÓN DE ANTÍGENOS E INMUNOGENOS

Los distintos preparados del VFA se crecieron por infección de monocapas confluentes de células BHK-21. Tras un periodo de adsorción (1 hora a 37° C), se retiró el inóculo de virus, se añadió el medio adecuado para esta línea celular y se continuo con la incubación a 37°C hasta conseguir un efecto citopático del 90%. En ese momento se

recogieron los sobrenadantes de infección, que una vez clarificados (centrifugación a 200 x g, durante 10 minutos) se conservaron a -70°C hasta el momento de ser usados.

La titulación de los preparados virales se realizó mediante ensayos de formación de placas (ufp) utilizando las monocapas confluentes de células BHK-21 en donde se crecieron los virus (Domingo y cols, 1980). Este ensayo se realizó en placas M6 y se utilizó un medio semi-sólido de agar noble (0.65% en DMEM). Tras 24-36 horas de incubación, las células se fijaron con formaldehído al 10% (v / v) en PBS y las placas de lisis formadas se visualizaron mediante tinción con cristal violeta 5% preparado en formaldehído 10%. El título del virus se expresó como ufp / ml.

5.2.3- INMUNIZACIÓN E INOCULACIÓN DE ANIMALES

*** Inmunización con péptidos**

Los cerdos fueron inmunizados por vía intramuscular con dos dosis de 0.35µm de péptido, con adyuvante de Freund (completo la primera dosis e incompleto la segunda) administradas en un intervalo de 18 días.

*** Inoculación con VFA**

Tanto los animales inmunizados como los controles (no inmunizados), se inocularon por vía intradérmica en rodete coronario, con 10⁴ pfu del aislado viral C-S8. Para ello, se utilizó un sobrenadante de infección clarificado preparado de la infección de monocapas confluentes de células BHK-21 con un efecto citopático del 90%. Este inóculo de virus se diluyó en PBS estéril. En general, la aparición de lesiones en los animales control comenzó a partir de los tres días post-inoculación.

Todos los animales inoculados con el VFA, inmunizados o no, se monitorizaron diariamente y el grado de protección se cuantificó teniendo en cuenta el día de aparición de las lesiones y la severidad de las mismas. Protección total se definió como la ausencia total de lesiones. Protección parcial se consideró cuando lesiones características del VFA se desarrollaron más tarde en el tiempo, que en los controles de infección (cerdos no inmunizados) y su distribución fue no generalizada.

Los signos clínicos de infección se cuantificaron tal y como describe Alexandersen y cols, 2003: cada pata con lesiones, 1 punto; lesiones en o alrededor de la boca, 1 punto; cojera o dificultad para estar de pie y caminar, 1 punto. Por lo tanto, la cuantificación

máxima de lesiones por animal es de 6. Con objeto de representar estos valores gráficamente, se creo una escala de 0-10 en la que el valor de 6 se representó como 10. Además de la aparición de lesiones, las temperaturas rectales de los animales inoculados con el VFA se registraron diariamente durante un periodo de 10 días tras la inoculación.

5.2.4- ENSAYOS DE CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA HUMORAL

5.2.4.1- SERONEUTRALIZACIÓN

La determinación de los títulos de Acs neutralizantes en suero se realizó siguiendo el protocolo estandarizado de ensayo de microneutralización en placas de 96 pocillos. Para ello se hizo diluciones seriadas en base dos de los sueros se incubaron durante 1 hora a 37°C con 100 TCID₅₀ del aislado del VFA C-S8. La actividad viral presente en dichas mezclas se determinó tras la adición de células BHK21. Los títulos se calcularon como el recíproco de la dilución final de suero capaz de neutralizar las 100 TCID₅₀ de virus en el 50% de los pocillos (Golding y cols, 1976). La actividad neutralizante presente en fluido nasal se determinó por el mismo método salvo que la dosis de virus utilizada fue de 10 TCID₅₀ (Francis y Black, 1983).

5.2.4.2- ELISAs

*** Anticuerpos específicos totales frente a VFA**

Para la determinación de Acs específicos frente al VFA se utilizó un ELISA en formato sandwich. Placas de 96 pocillos Maxisorp se tapizaron con suero de conejo hiperinmune anti-VFA serotipo C, diluido en tampón carbonato / bicarbonato. Las placas se bloquearon con la solución de bloqueo y se incubaron con antígeno viral preparado a partir sobrenadante de células BHK21 infectadas con el virus. Los sueros se analizaron por duplicado a una dilución de 1 / 200, y los Acs específicos se detectaron con proteína A marcada con peroxidasa. Como sustrato se utilizó OPD, cuya reacción se paró tras 30 minutos de incubación, utilizando la solución de frenado. Los títulos de Acs se expresan como el valor de A₄₉₂ que da el suero así diluido. Los valores de A₄₉₂ de los sueros a tiempo 0 fueron todos < a 0.2.

*** Determinación del isótipo IgG1 / IgG2 e IgA de los Acs anti-VFA**

El isótipo (IgG1, IgG2 e IgA) de los Acs específicos frente al VFA se determinaron en suero (IgGs) o en suero y fluidos nasales (IgA), utilizando una modificación del ELISA indirecto doble sandwich descrito por Salt y cols, 1996. Anticuerpos monoclonales específicos de estos isótipos, fueron suministrados por Serotec. Los sueros fueron analizados en diluciones seriadas en base 3 desde una dilución 1 / 50 (1 / 10 en el caso de los fluidos nasales). Cien microlitros de cada muestra se analizaron por pocillo. En el caso de los fluidos nasales, se realizaron dos incubaciones consecutivas con la muestra, antes de añadir el anticuerpo comercial anti IgA porcina, con objeto de incrementar la sensibilidad de este ensayo. En estos análisis se encontró que en la curva de titulación el valor de A_{492} de 1,0, siempre se localizaba en la parte lineal de la curva. Por ello, el título de anticuerpos se expresó como el recíproco de la última dilución, calculada por interpolación, que da una absorbancia de 1 por encima del fondo del ensayo. Los títulos de IgA en fluido nasal se expresaron como el valor de A_{492} que da este fluido diluido al 1 / 10.

*** Anticuerpos frente a la proteína 3ABC del VFA**

La producción de Acs frente a la proteína no estructural 3ABC del VFA, indicativa de replicación viral, se determinó mediante un ELISA indirecto, utilizando como antígeno la proteína 3ABC recombinante (Blanco y cols, 2002).

5.2.5- ENSAYOS DE CARACTERIZACIÓN DE RESPUESTA CELULAR

5.2.5.1- ENSAYOS DE LINFOPROLIFERACIÓN

Estos ensayos se realizaron en placas de plástico estériles de 96 pocillos fondo U, utilizando una concentración de 3×10^5 células / pocillo. Las CMSP se estimularon con 3 concentraciones distintas de péptidos sintéticos (50, 20 y 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$); 2 de virus ($1,2 \times 10^6$ pfu / ml y $2,4 \times 10^5$ pfu / ml) y con concanavalina-A (Con-A) (2.5 $\mu\text{g} / \text{pocillo}$). Como control negativo, se emplearon CMSP incubadas con medio solo (control de estimulaciones con péptido) o con extracto de células BHK21 sin infectar (control de estimulaciones con el VFA). Todas las incubaciones se realizaron a 37°C en presencia

de un 5% de CO₂, por triplicado y en un volumen final de 200 µl. Las CMSP estimuladas se incubaron durante 3 días y se marcaron durante 18 horas con. 1 Ci / pocillo de [³H]-T. La incorporación del radioactivo a las células se midió, empleando un contador de centelleo (Microbeta counter Becton Dickinson). Los resultados se expresan como índices de estimulación (IE) (cpm cultivos estimulados / cpm del control sin antígeno). Los datos presentados a lo largo de esta Tesis son, en todos los casos, el resultado de la media geométrica de los triplicados realizados.

5.2.5.2- DETECCIÓN DE CITOQUINAS PORCINAS

*** IFN- γ**

La determinación de IFN- γ , se realizó en sobrenadantes de CMSP estimuladas en las mismas condiciones descritas en el apartado 5.2.5.1, recogidos a las 72 horas. Este ensayo se realizó en placas Maxisorp, siguiendo las recomendaciones del fabricante del kit, en este caso Pierce.

*** IL-10**

La determinación de IL-10, se realizó en sobrenadantes de CMSP estimuladas en las mismas condiciones descritas en el apartado 5.2.5.1, recogidos a las 48 horas. Para este análisis se siguió las recomendaciones del fabricante del kit, en este caso Biosource.

5.2.6- ANÁLISIS Y DETECCIÓN DEL VFA MEDIANTE RT-PCR

5.2.6.1- EXTRACCIÓN DE RNA VIRAL

La extracción de RNA viral se realizó a partir de 0.250 ml de muestra (sangre o hisopos nasales / faringeos), utilizando 0.8 ml de Tri-Reagent, e incubando la muestra 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 0.2 ml de cloroformo, se incubó la mezcla 10 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugó a 10.000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. Se recogió la fase acuosa superior conteniendo el RNA. Finalmente se precipitó con isopropanol para luego lavar con etanol.

5.2.6.2- OBTENCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DEL cDNA (RT-PCR)

La reacción de RT-PCR se realizó utilizando los oligos descritos por Saiz. M y cols, 2003. La obtención del cDNA se realizó a partir de 1µl de muestra (RNA extraído), en una solución que contenía 2,5µl de Buffer (10 X), 2µl de MgCl₂, 2µl de dNTPS (10 mM), 0.5 µl del inhibidor de RNAsa (20 U / µl), 0.25µl de la enzima MuMLV (50 U / µl), 0.125 µl de la polimerasa Taq Gold, 16.87µl de H₂O y 0.25 µl de cada uno de los oligos sense y antisense (5-10 pmoles). La obtención del cDNA se realizó tras incubar esta mezcla a 48°C, 30 minutos y a 95° C, 10 minutos.

La amplificación del DNA se realizó utilizando 40 ciclos de las siguientes temperaturas y tiempos: 94°C (35 seg;), 50°C (45 seg) y 72°C (45seg.) Para finalizar se calentó la muestra a 72°C durante 7 minutos. El producto PCR se analizo mediante electroforesis de agarosa (2,5%).

6. RESULTADOS

Estudios realizados con anterioridad en nuestro grupo permitieron identificar un epítopo T cooperador entre las posiciones [21-35] de la proteína no estructural 3A del VFA (Blanco y cols, 2001). Dicho epítopo se caracterizó como dominante, heterólogo y con una secuencia conservada entre serotipos, por lo tanto idóneo para ser incluido en la formulación de una nueva vacuna frente al VFA.

Por ello, el primer objetivo propuesto en esta Tesis ha consistido en analizar la inmunogenicidad y protección frente al VFA conferida por péptidos sintéticos que incluyen en su formulación el epítopo T 3A[21-35], junto con el epítopo B correspondiente al sitio A (VP1[136-154]). Estos estudios se han realizado utilizando como modelo animal el cerdo, hospedador natural del VFA, por lo que los resultados obtenidos tienen un importante valor práctico.

6.1- ANÁLISIS DE LA INMUNOGENICIDAD Y PROTECCIÓN INDUCIDAS EN CERDO POR PÉPTIDOS LINEALES QUE REPRODUCEN EPÍTOPOS T Y B DEL VFA

Para realizar este análisis se sintetizaron dos péptidos lineales: i) péptido B, correspondiente al epítopo inmunodominante de VP1, denominado sitio A y ii) péptido TB, en el que el epítopo B de VP1 se sintetizó colinealmente con el epítopo T de la proteína no estructural 3A (Figura 6.1).

En este estudio se utilizaron 16 cerdos domésticos Landrace x Large White de 8 semanas de edad, que se distribuyeron al azar en tres grupos. Los grupos 1 y 2 consistieron en 6 animales cada uno, inmunizados intramuscularmente con 0.35µm de péptido B (grupo 1) o péptido TB (grupo 2), emulsionados con adyuvante completo de Freund el día 0 y con adyuvante incompleto de Freund el día 21. El grupo 3, control de infección, consistió en 4 cerdos no inmunizados.

Los animales se alojaron durante todo el experimento en el animalario del CISA (con nivel de biocontención 3), separando cada grupo en boxes diferentes. Todos los cerdos se desafiaron por vía intradérmica con 10⁴ pfu del aislado CS-8 del VFA inoculado en

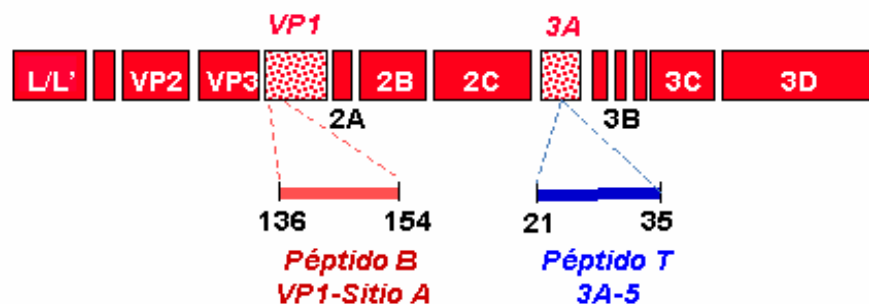


Fig. 6.1- Localización en el genoma de VFA de los epítomos B y T sintetizados en forma de péptidos lineales B y TB.

una de las patas. El desafío viral de los animales inmunizados se realizó el día 39 (18 días después de administrar la segunda dosis de péptido).

A distintos tiempos post-inmunización y post-desafío se recogieron muestras de sangre y suero para valorar la respuesta humoral y celular. Tras el desafío con virus, los animales se monitorizaron diariamente para registrar la aparición de síntomas y lesiones típicas de un cuadro agudo de FA, y así determinar los niveles de protección inducidos por los péptidos utilizados. Así mismo, tras el desafío se recogieron muestras de suero, sangre, hisopos nasales e hisopos faríngeos para evaluar la respuesta humoral y determinar la excreción de virus. El día 59 (10 días post-desafío) los animales fueron sacrificados y en la necropsia se recogieron distintos tejidos (corazón, pulmón, bazo, hígado, tonsilas, y ganglios) para analizar la presencia de virus en ellos.

6.1.1- PROTECCIÓN FRENTE AL VFA

En los animales del grupo 3 (cerdos control de la infección), se registraron temperaturas por encima de 39,5°C a los dos días post-infección (Figura 6.2). Dos de los cuatro cerdos de este grupo, tuvieron temperaturas por encima de 41°C durante más de 2 días. En esos animales, se desarrollaron pequeñas vesículas en el morro, labios y lengua, y vesículas algo mayores en el área interdigital del rodete coronario, en más de dos patas. Estas lesiones aparecieron alrededor de los 3 días post-infección. En el día 4 post-infección, tres de los 4 cerdos presentaban ya un cuadro generalizado de infección por VFA, cuantificado según criterios descritos en Materiales y Métodos (apartado 5.2.3) con un valor próximo a 10 (Figura 6.2).

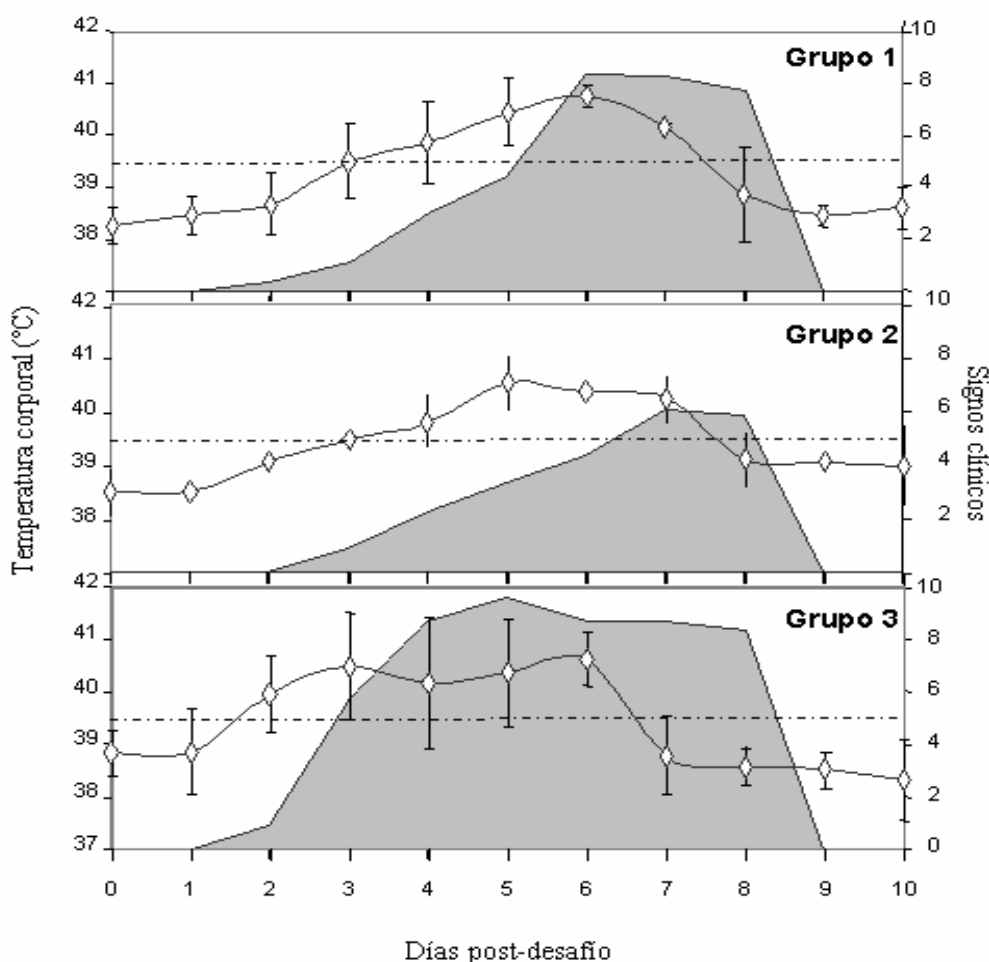


Fig. 6.2- Curso de la infección con el VFA El gráfico muestra el curso de la infección con el VFA en los cerdos inmunizados con el péptido B (grupo 1), péptido TB (grupo 2) o PBS (grupo 3) tras el desafío con el VFA. El tiempo representado en el eje X se da en días. La temperatura corporal media (izquierda) se muestra junto con el desarrollo de lesiones clínicas cuantificadas en escala de 0 a 10 (derecha), en el eje Y.

Ninguno de los 12 cerdos inmunizados con los péptidos B o TB registraron temperaturas por encima de 41°C, durante los 10 días que fueron monitorizados (Figura 6.2). En estos animales se registraron temperaturas de 39,5°C a los 4 días post-desafío, lo que supone un retardo de dos días en la aparición de pirexia, comparado con los cerdos control (Grupo 3).

En los animales inmunizados se encontraron aftas en más de dos patas alrededor del día 5 (grupo 1) o 6 (grupo 2), post-desafío. El 50% de los animales inmunizados con el péptido B (cerdos 460, 357 y 361) llegaron a desarrollar infección generalizada, aunque de forma significativamente retardada (7 días post-desafío) en comparación con los cerdos control del grupo 3.

Sólo uno de los cerdos inmunizados con el péptido TB desarrolló lesiones generalizadas (cerdo 359), y lo hizo a los 7 días post-desafío.

Los valores máximos de lesiones registradas en cada uno de los grupos fueron: 8.4 (grupo 1), 6.1 (grupo 2) y 9.6 (grupo 3) (Figura 6.2).

6.1.2- DETECCIÓN DE RNA DEL VFA EN MUESTRAS BIOLÓGICAS TRAS EL DESAFÍO

Con objeto de determinar el grado de protección inducido en los diferentes grupos de animales, muestras de sangre e hisopos nasales y faringeos recogidos a 0, 3, 5, 7 y 10 días post-desafío, se analizaron mediante RT-PCR (Materiales y Métodos, apartado 5.2.6), para detectar la presencia del VFA. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 6.1.

En todos los animales del grupo 3 (control de infección) se detectó virus en sangre, hisopos nasales y faringeos a los 3 días post-infección. La presencia de RNA viral en sangre e hisopos faríngeos siguió siendo detectable a los 7 días post-infección en dos de los cuatro animales, y dejó de serlo a los 10 días post-infección. Sin embargo, en los hisopos nasales de estos animales se detectó RNA del VFA durante más días; 4 animales eran positivos a los 7 días post-infección, y tres de ellos lo seguían siendo a los 10 días post-infección.

A los 3 días post-desafío solo tres muestras de sangre fueron positivas al VFA, dos correspondientes a cerdos inmunizados con el péptido B y una a un animal inmunizado con el péptido TB. A este tiempo (3 días post-desafío), en los animales del grupo 1 (péptido B), se detectó RNA viral en los hisopos faríngeos de los cuatro cerdos, y en los hisopos nasales de solo dos de ellos. En el grupo 2 (péptido TB) solo los hisopos faringeos de dos cerdos fueron positivos a 3 días post-desafío.

En los cerdos inmunizados (grupos 1 y 2) el número total de muestras positivas al VFA fue significativamente inferior comparado con las detectadas en el grupo 3.

A los 7 días post-desafío la presencia de virus en muestras de los animales inmunizados de ambos grupos fue claramente diferente. Mientras que en los animales inmunizados con péptido B (grupo 1), se detectó RNA del VFA en hisopos nasales y faringeos de 3 de los 4 animales, en los cerdos inmunizados con el péptido TB (grupo 2), sólo el hisopo faríngeo de un animal resultó positivo. A los 10 días post-desafío no se detecto

Tabla 6.1. Detección del RNA del VFA mediante RT-PCR en muestras de sangre, hisopos nasales y faringeos recogidos a distintos días post-desafío, de animales inmunizados y no inmunizados con péptidos lineales.

Grupo	Inmunógeno	Cerdo	Días post-desafío											
			0			3			7			10		
			S ^a	N ^b	F ^c	S	N	F	S	N	F	S	N	F
1	péptido B	357	-	- ^d	-	-	+ ^e	+	-	-	-	-	-	-
		358	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
		361	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
		362	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
2	péptido TB	926	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
		359	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
		360	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		356	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
3	PBS	384	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
		385	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-
		387	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-
		397	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-

^a Sangre

^b Hisopo nasal

^c Hisopo faríngeo

^d RNA no detectado

^e RNA detectado

RNA viral en ninguna de las muestras analizadas de los animales inmunizados, tanto del grupo 1 como del grupo 2.

Con objeto de determinar la presencia de virus en distintos órganos de los animales inmunizados y control tras el desafío con el VFA, en la necropsia realizada a los 10 días post-desafío, se recogieron muestras de corazón, pulmón, bazo, hígado, riñón, tonsila y ganglio linfático mesentérico, que se analizaron por RT-PCR (Tabla 6.2).

En los ganglios linfáticos analizados de todos los animales (inmunizados y controles), se detectó presencia de RNA viral. Sin embargo, ninguna de las muestras de pulmón analizadas resultó positiva. La principal diferencia encontrada en estos análisis, entre los cerdos del grupo 3 y los inmunizados de los grupos 1 y 2, se encontró en las muestras de bazo y riñón. En todos los animales del grupo 3 se detectó RNA viral en bazo, y en tres de ellos también en riñón. Sin embargo, solo tres muestras de bazo de los animales

inmunizados fueron positivas; dos cerdos del grupo 1, y una de un animal del grupo 2 (Tabla 6.2).

Tabla 6.2. Detección del RNA del VFA mediante RT-PCR en muestras biológicas recogidas durante la necropsia de los animales sacrificados a los 10 días post-infección.

Grupo	Inmunógeno	Cerdo	Detección de RNA del VFA						
			Corazón	Pulmón	Bazo	Hígado	Riñón	Tonsila	Ganglio linfático
1	péptido B	357	-	-	-	-	-	-	+
		358	-	-	-	-	-	+	+
		361	+	-	+	+	-	+	+
		362	-	-	+	-	-	+	+
2	péptido TB	926	+	-	-	-	-	-	+
		359	-	-	-	-	-	+	+
		360	-	-	-	+	-	-	+
		356	-	-	+	-	-	+	+
3	PBS	384	+	-	+	+	+	+	+
		385	+	-	+	-	+	+	+
		387	-	-	+	-	+	+	+
		397	-	-	+	+	-	+	+

En ninguna de las muestras de riñón de los animales inmunizados se detectó presencia de RNA del VFA.

En el análisis del resto de muestras; corazón, hígado o tonsilas, las diferencias encontradas entre los animales de los tres grupos no fueron significativas (Tabla 6.2).

6.1.3- RESPUESTA INMUNE HUMORAL INDUCIDA POR LOS PÉPTIDOS LINEALES

La respuesta humoral inducida en los cerdos inmunizados con los péptidos B y TB se valoró en sueros recogidos los días 0, 14, 21, 39 y 49. En ninguno de los animales se detectaron títulos significativos de anticuerpos frente al VFA tras la administración de la primera dosis de péptido, días 14 y 21 (datos no mostrados).

Sin embargo, el día 39 (18 días post-boost), todos los animales de ambos grupos (1 y 2), presentaron títulos de anticuerpos neutralizantes alrededor de 2 (Tabla 6.3). La magnitud de esta respuesta neutralizante fue similar en los dos grupos, sin diferencias significativas.

Tras el desafío, el día 49 los títulos de anticuerpos neutralizantes se incrementaron en todos los animales inmunizados hasta alcanzar títulos iguales o mayores a 3, similares a los detectados en los cerdos control no inmunizados con péptido (Tabla 6.3).

Tabla 6.3. Título de anticuerpos neutralizantes (a) y anticuerpos frente al VFA determinados por ELISA (b), antes (c) y después del desafío viral (d), en los animales inmunizados y no inmunizados con péptidos lineales. Los títulos se expresan en log10, calculados tal como se indica en Materiales y Métodos (apartado 5.2.4)

Grupo	Inmunógeno	Cerdo	VNT ^a		IgG1 ^b		IgG2 ^b		IgA ^b	
			39 ^c	49 ^d	39	49	39	49	39	49
1	péptido B	460	2,5	2,8	5,0	4,1	4,4	4,3	4,1	3,7
		544	2,2	2,5	2,7	3,0	2,5	2,7	3,0	2,8
		357	2,5	3,4	3,4	2,8	3,1	2,7	2,8	3,0
		358	2,2	3,4	2,7	2,9	2,4	3,0	2,4	2,8
		361	2,9	3,7	2,3	3,6	2,2	3,8	2,7	3,0
		362	2,2	3,1	2,5	3,1	2,1	3,0	2,2	3,0
2	péptido TB	993	2,5	2,8	2,0	2,1	2,0	2,0	2,3	2,5
		934	2,2	2,8	2,8	2,8	2,6	2,6	2,7	2,8
		926	1,6	2,5	2,3	2,8	2,2	2,7	2,1	2,7
		359	1,9	3,1	2,0	2,8	2,4	3,2	2,5	2,7
		360	3,1	3,4	2,6	3,1	2,6	3,3	2,6	2,9
		356	2,5	2,8	3,2	3,6	2,9	3,4	2,9	3,0
3	PBS	384	- ^e	3,1	-	1,0	-	2,9	-	3,5
		385	-	2,8	-	1,4	-	2,2	-	2,7
		387	-	3,1	-	2,3	-	2,3	-	2,9
		397	-	2,8	-	1,0	-	2,4	-	2,7

^e Muestra no disponible

La producción de anticuerpos específicos frente al VFA de isótipos IgG1, IgG2 e IgA se detectaron al igual que los anticuerpos neutralizantes, solo tras la administración de la segunda dosis de péptido. Los títulos de los tres isótipos analizados fueron similares en los animales inmunizados con péptido B y TB, todos superiores a 2 (Tabla 6.3). La magnitud de la respuesta de IgG1 en los animales inmunizados fue significativamente superior a la detectada en los animales control de infección (grupo 3), mientras que el título IgG2 e IgA fue similar en los animales de los tres grupos (Tabla 6.3).

Tras el desafío (día 49), los títulos de los tres isótipos analizados se incrementaron ligeramente en los animales inmunizados de ambos grupos. A este tiempo (día 49) la magnitud de la respuesta de IgG1 e IgG2 fue mayor en los animales inmunizados que en los controles de infección (grupo 3), mientras que la respuesta de IgA es similar en los cerdos de los tres grupos (Tabla 6.3).

6.1.4- RESPUESTA INMUNE CELULAR INDUCIDA POR LOS PÉPTIDOS LINEALES

La respuesta inmune linfoproliferativa inducida en los cerdos inmunizados se valoró estimulando *in vitro* con péptido B, TB y virus, CMSP recogidas de estos animales los días 0 (antes de la inmunización), 21 y 39 post-inmunización.

Los patrones de linfoproliferación obtenidos en el estudio temporal de la respuesta celular fueron similares para todos los cerdos en los dos grupos (datos no mostrados). No se detectaron respuestas linfoproliferativas significativas ($IE > 2$) frente a ninguno de los estímulos utilizados antes de la inmunización, mientras que el día 21 post-inmunización comienza a ser detectable una respuesta específica frente a péptido, con IE bajos (< 4).

Sólo se detectó respuesta significativa frente a virus tras la administración de la segunda dosis de péptido. La respuesta linfoproliferativa óptima (IE máximos) frente a péptido y virus se detectó el día 39 post-inmunización (18 días post-boost) (Figura 6.3). Este día todos los cerdos de los dos grupos respondieron a la estimulación *in vitro* con péptidos B (cerdos grupo 1) o TB (cerdos grupo 2). Estas respuestas mostraron variaciones individuales en magnitud, pero todas fueron dependientes de dosis y los valores máximos se obtuvieron con concentraciones de péptido de 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

La respuesta linfoproliferativa frente al VFA sin embargo fue más irregular, ya que no todos los animales fueron capaces de responder frente a este estímulo. Todos los cerdos del grupo 2 excepto uno (cerdo 359) respondieron con IE significativos frente a virus, mientras que solo dos animales del grupo 1 (cerdos 544 y 358) lo hicieron (Figura 6.3). En general la magnitud de la respuesta frente a virus fue más elevada en los cerdos inmunizados con el péptido TB que en los inmunizados con el péptido B. Además, en dichos animales se observó una clara correlación entre la respuesta al péptido TB y el virus (Figura 6.3).

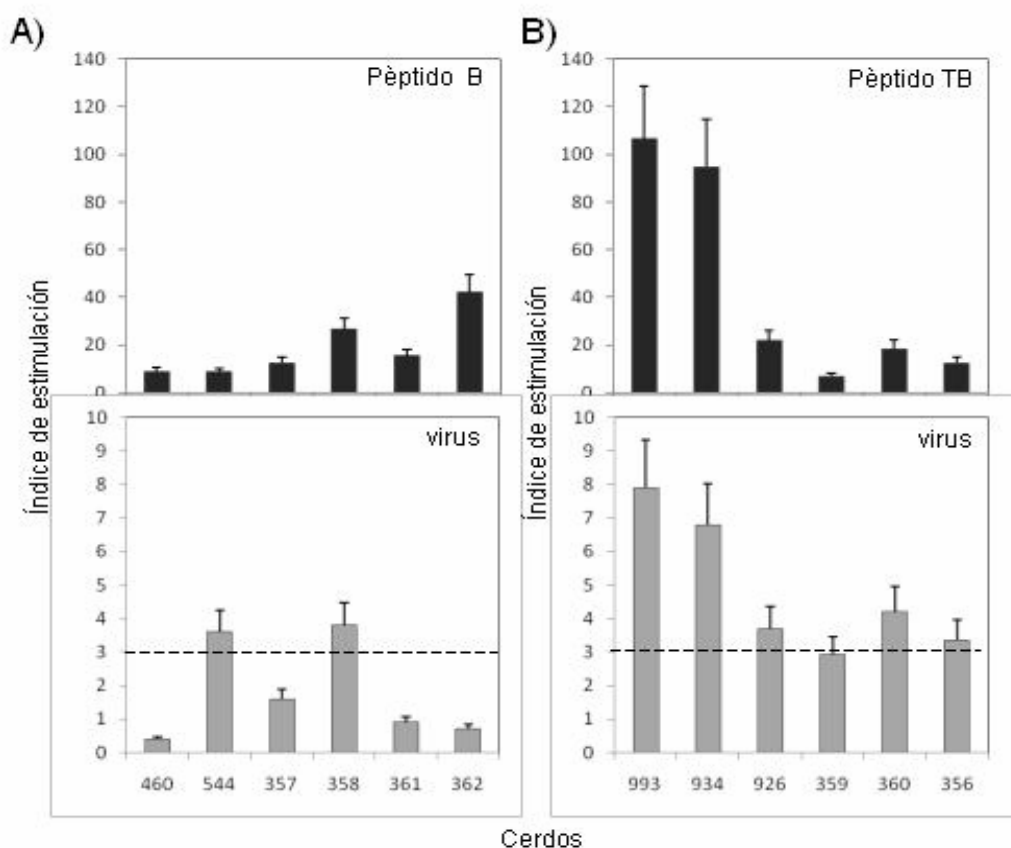


Fig. 6.3- Respuesta linfoproliferativa óptima (39 días post-inmunización) obtenida frente a los -péptidos B, TB y VFA, por CMSP de los cerdos inmunizados con el péptido B (A) o TB (B). Los resultados se expresan como IE, donde las barras de error corresponden a la desviación standard. Con línea punteada se indica el nivel por encima del cual se considera la respuesta significativa ($IE \geq 3$). Las cpm encontradas frente a medio o extracto de células (control de la respuesta frente a virus) fueron en todos los casos inferiores a 2000.

6.2- ANÁLISIS DE LA INMUNOGENICIDAD Y PROTECCIÓN INDUCIDA EN CERDO POR UN PÉPTIDO DENDRIMÉRICO QUE REPRODUCEN UN EPÍTOPO T Y UNO B DEL VFA

El principal objetivo de este apartado fue valorar si la presentación de los epítopos B y T del VFA, en una estructura dendrímica, permitía incrementar la inmunogenicidad y protección frente al virus, inducida por las construcciones lineales analizadas en el apartado anterior. Para ello se diseñó y sintetizó el que denominamos péptido B₄T, que

incluye una copia del epítipo T [3A(21-35)] unido por su extremo N-terminal a cuatro copias del epítipo B [VP1(136-154)] (Figura 6.4).

Para realizar este estudio se utilizaron 8 cerdos domésticos Landrace x Large White de 8 semanas de edad. Cuatro de ellos (cerdos 1, 2, 3 y 4) se inmunizaron intramuscularmente con 0.35µm del dendrimero B₄T emulsionados con adyuvante completo de Freund el día 0 y con adyuvante incompleto de Freund el día 21. Para evaluar la posible transmisión del VFA desde los animales inmunizados tras el desafío, en el mismo box que estos cerdos se incluyeron dos adicionales (cerdos 5 y 6) no inmunizados, como animales contacto.

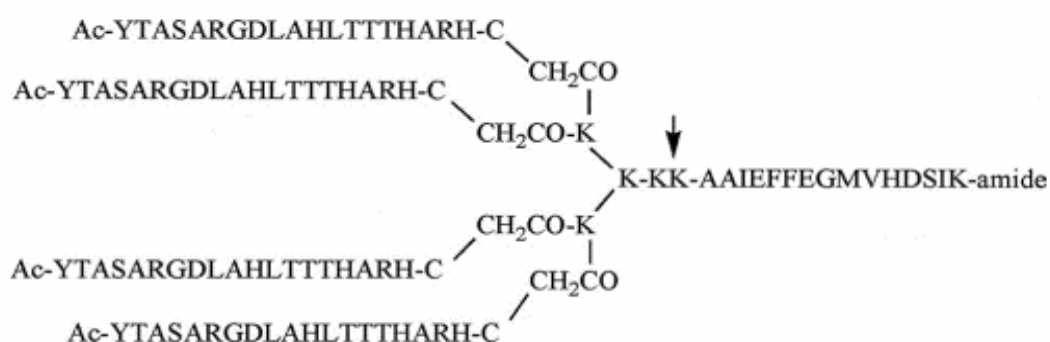


Fig. 6.4- Estructura del péptido dendrimérico B₄T sintetizado para ser utilizado como inmunógeno. La flecha indica el sitio de corte específico para la proteasa celular cathepsina D.

A los 18 días post-boost, los cerdos inmunizados se desafiaron por vía intradérmica con 10⁴ pfu del aislado CS-8 del VFA inoculado en una de las patas. Dos cerdos más (cerdos 7 y 8) controles de infección, se desafiaron de la misma manera en un box diferente. Los animales inmunizados (cerdos 1 al 4) y los dos controles de infección (cerdos 7 y 8) se monitorizaron diariamente durante 10 días para determinar la aparición de signos clínicos de la infección con el VFA (vesículas en patas y morro, pirexia, etc) y entonces se sacrificaron. Los dos animales contacto (cerdos 5 y 6) también se monitorizaron durante los 10 días posteriores al desafío de los inmunizados, con objeto de detectar transmisión viral. Pasado este periodo, los cerdos contacto fueron desafiados intradérmicamente con la misma dosis de virus que los otros, y se monitorizaron diariamente durante 10 días adicionales para registrar la aparición de lesiones típicas de infección con el VFA.

A distintos tiempos post-inmunización y post-desafío se recogieron muestras de sangre, suero e hisopos nasales para valorar la respuesta humoral y celular. Así mismo, tras el desafío se recogieron muestras de suero, sangre, hisopos nasales e hisopos faringeos para evaluar la respuesta humoral, celular y así como determinar la excreción de virus.

6.2.1- DISEÑO Y SÍNTESIS DEL PÉPTIDO DENDRIMÉRICO B₄T

La estructura general del péptido dendrimérico del VFA (B₄T) sintetizado y usado como inmunógeno, se muestra en la Figura 6.4. Esta construcción se diseñó para presentar en una sola molécula, cuatro copias del epítipo B localizado entre las posiciones 136-154 de VP1, denominado sitio A, unidas a un epítipo T de la proteína no estructural 3A (residuos 21-35). Esta unión se realizó a través de un árbol de lisinas unido a dos residuos adicionales de este aa, que definen un sitio de corte de la catepsina D. Se ha sugerido que esta proteasa está implicada *in vivo* en el procesamiento de antígenos por vía del MHC de clase II (Tam. J, 1996).

Para generar el péptido B₄T se seleccionó un sistema de síntesis convergente, basado en la unión química a través de grupos tioeter de: i) el péptido tetravalente que reproduce el epítipo T, elongado en su extremo amino terminal con 2 (sitio catepsina D) más 3 lisinas, que constituyen el core del dendrímero y ii) el péptido de 19 aa que corresponde al epítipo B, con un grupo acetilo en su extremo amino terminal y elongado en su extremo carboxi con una cisteína. Esta ligación química se realizó a pH 7 y se monitorizó mediante análisis por HPLC y espectrofotometría de masas MALDI-TOF. El péptido utilizado en la inmunización, consistió en fracciones purificadas y enriquecidas mediante HPLC preparativa, de la construcción B₄T.

6.2.2- PROTECCIÓN FRENTE AL VFA

Tras el desafío viral de los cerdos inmunizados con el péptido B₄T, estos animales no mostraron síntomas clínicos de infección por el VFA, desarrollo de aftas, cojera o anorexia. Además, en ninguno de estos animales se registraron temperaturas corporales por encima de 39,5°C (Tabla 6.4).

En la inmunización con péptidos lineales observamos que los cerdos inmunizados con el péptido TB, tras el desafío excretaban virus en muestras de tracto respiratorio durante un número menor de días que los animales control (no inmunizados), y los animales

inmunizados con el péptido B. Por ello en la inmunización con el péptido dendrimérico B₄T, nos propusimos valorar la posible transmisión del VFA a cerdos sanos, desde los animales inmunizados con el dendrímero y desafiados. Para ello introducimos en el mismo box de los animales inmunizados con el péptido dendrimérico dos cerdos adicionales (cerdos 5 y 6) no inmunizados, como animales contacto. Durante los 10 días que estos animales estuvieron en contacto directo con los cuatro cerdos inmunizados - desafiados, ninguno de los dos desarrolló vesículas ni registró temperaturas elevadas o mostró algún otro signo característico de infección por el VFA.

Tabla 6.4. Evidencia de la protección inducida en los animales inmunizados con el péptido B₄T.

Cerdo	Inmunógeno	Protección ^a	Fiebre ^b	Viremia ^c	NSP-ELISA	Detección del RNA del VFA en muestras de tracto respiratorio (días post-inoculación) ^c			
						0	3	7	10
1	B ₄ T	+	-	-	-	N	-	-	-
						F	-	-	-
2	B ₄ T	+	-	-	-	N	-	-	-
						F	-	-	-
3	B ₄ T	+	-	-	-	N	-	-	-
						F	-	-	-
4	B ₄ T	+	-	-	-	N	-	-	-
						F	-	-	-
5^d	PBS	-	+	+	+	N	-	+	-
						F	-	+	+
6^d	PBS	-	+	+	+	N	-	+	-
						F	-	+	+

^a Ausencia de signos clínicos significativos de FA. Una única vesícula muy pequeña (< 5 mm diámetro), resuelta rápidamente (< 24 h), se observó en el cerdo 3 y no se considero significativa.

^b Temperatura rectal > 39.5°C

^c Detección del RNA del VFA mediante RT-PCR en sangre (viremia), hisopos nasales (N) y faringeos (F).

^d Los resultados para estos cerdos corresponden a análisis realizados tras la inoculación intradérmica del virus (día 59, 10 días post-infección).

Tras los 10 días post-contacto y con objeto de confirmar la no transmisión del virus, los cerdos 5 y 6 se inocularon intradérmicamente con la misma dosis de virus utilizada en el desafío de los cerdos inmunizados. Como era de esperar, en este caso los dos animales si desarrollaron viremia y lesiones características del VFA, como cojera, fiebre y

desarrollo de vesículas en las cuatro patas y morro el día 3 (cerdo 5) y el día 4 (cerdo 6) post-inoculación.

Los dos animales control de infección (cerdos 7 y 8) no inmunizados e inoculados intradérmicamente con el VFA en un box separado, desarrollaron lesiones de la enfermedad 3 días post-inoculación (datos no mostrados).

Estos resultados indican que la inmunización con el dendrímero B₄T es capaz de conferir una sólida protección frente al desafío con el VFA, evitando la transmisión de la enfermedad a animales contacto.

6.2.3- DETECCIÓN DE RNA DEL VFA EN MUESTRAS BIOLÓGICAS TRAS EL DESAFÍO

Del mismo modo que se siguió en los experimentos de inmunización con péptidos lineales, en la inmunización con el dendrímero B₄T se tomaron muestras de sangre e hisopos tras el desafío, con objeto de determinar el grado de protección inducido por este inmunógeno. Las muestras recogidas a días 0, 3, 5, 7 y 10 post-desafío, se analizaron mediante RT-PCR (Materiales y Métodos, apartado 5.2.6.), para detectar la presencia del VFA. En ninguna de las muestras de sangre, hisopos nasales o faríngeos recogidos tras el desafío de los cerdos inmunizados con el dendrímero B₄T fue posible amplificar RNA del VFA mediante RT-PCR (Tabla 6.4).

Los mismos resultados se obtuvieron en el análisis de las muestras recogidas de los cerdos 5 y 6, tras el periodo de contacto con los animales inmunizados y desafiados (datos no mostrados). Sin embargo, en correlación con la sintomatología clínica característica de FA observada en estos animales tras la inoculación intradérmica del virus, en las muestras recogidas a esos tiempos (post-inoculación), se pudo amplificar RNA viral en muestras de sangre (3 días post-infección), y en hisopos nasales y faríngeos (Tabla 6.4).

Como era de esperar, en los dos cerdos control de infección (cerdos 7 y 8) se detectó también RNA viral en distintas muestras recogidas tras la inoculación (datos no mostrados).

Estos resultados indican que el dendrímero B₄T es capaz de limitar la replicación del VFA *in vivo*, confiriendo protección clínica a los animales inmunizados e impidiendo la transmisión de la enfermedad a animales sanos en contacto con ellos.

6.2.4- RESPUESTA INMUNE HUMORAL INDUCIDA POR EL DENDRÍMERO B₄T

La respuesta humoral inducida en los cerdos inmunizados con el péptido dendrimérico se valoró en sueros recogidos los días 0, 14, 21, 39 y 49. En los dos cerdos contacto (cerdos 5 y 6) además se analizó el día 59 (10 días post-inoculación).

Tabla 6.5. Evidencia de la protección inducida en los animales inmunizados con el péptido B₄T.

Cerdo	Días post-inmunización							
	0	14	21 ^a	39	49 ^b	59 ^c		
	VNT ^d /ELISA ^e	VNT / ELISA	VNT / ELISA	VNT / ELISA VN-NS ^f	VNT / ELISA VN-NS ^f	VNT / ELISA		
1	< 1 / 0.23	1 / 0.48	1.3 / 0.94	2.2 / 1.58	1.8	2.2 / 1.48	1.2	- ^g
2	< 1 / 0.25	1 / 0.41	1.3 / 1.09	1.9 / 1.46	1.5	2.2 / 1.38	1.8	-
3	< 1 / 0.22	1 / 0.31	1.3 / 0.45	1.9 / 1.34	1.2	2.2 / 1.38	1.8	-
4	< 1 / 0.21	1 / 0.34	1 / 0.84	2.2 / 1.55	1.8	2.2 / 1.57	1.8	-
5	< 1 / 0.20	-	-	-		< 1 / 0.30	< 1	8 / 1.73
6	< 1 / 0.23	-	-	-		< 1 / 0.25	< 1	4 / 1.61

^a Ausencia de signos clínicos significativos de FA. Una única vesícula muy pequeña (< 5 mm diámetro), resuelta rápidamente (< 24 h), se observó en el cerdo 3 y no se consideró significativa.

^b Temperatura rectal > 39.5°C

^c Detección del RNA del VFA mediante RT-PCR en sangre (viremia), hisopos nasales (N) y faringeos (F)

^d Los resultados para estos cerdos corresponden a análisis realizados tras la inoculación intradérmica del virus (día 59, 10 días post-inoculación).

^e Valor de OD₆₂₀ obtenido en el análisis por ELISA del suero diluido 1/200.

^f Título de anticuerpos neutralizantes en hisopos nasales (log₁₀ de la última dilución de suero capaz de neutralizar 10 TCID₅₀ del VFA homólogo)

^g Suero no disponible

Títulos significativos de anticuerpos neutralizantes se detectaron ya en los cuatro animales inmunizados con el dendrímero B₄T a los 14 días de administrar la primera dosis de péptido. Estos títulos siguieron incrementándose hasta el día 21 post-inmunización (Tabla 6.5). Tras la administración de la segunda dosis de péptido, estos títulos se incrementaron hasta valores de 2 log, el día 39 (18 días post-boost). Después del desafío con el VFA, los títulos de anticuerpos neutralizantes se incrementaron solo

ligeramente en los cerdos 2 y 3, pero se mantuvieron sin cambios en los cerdos 1 y 4 (Tabla 6.5).

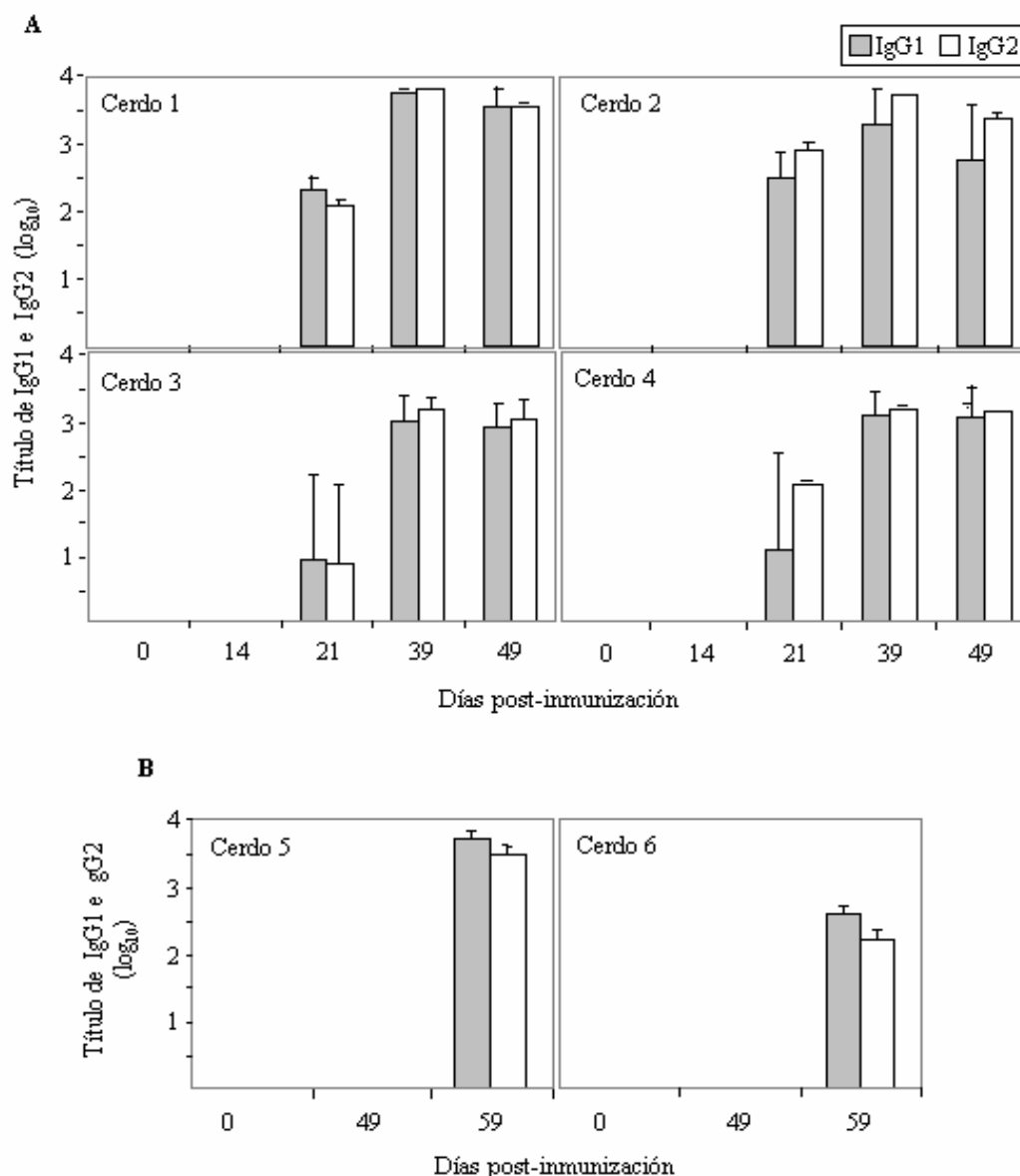


Fig. 6.5- Respuesta IgG1 / IgG2 dendrímero. En la Fig. 6.5(A) corresponde a los resultados de los cerdos inmunizados y en la Fig. 6.5(B), a los datos de los cerdos contacto. Los títulos que se muestran en esta gráfica se expresan en (\log_{10}) correspondiente a la extrapolación de la dilución del suero donde se obtuvo una 1.0 unidad de DO a una longitud de onda de A_{492} . Cada barra muestra la media geométrica de dos determinaciones con sus respectivas barras de desviación standard. El día 21 corresponde al día cuando se le dio el boost a los cerdos inmunizados (1-4). El día 39 corresponde al día del desafío de los inmunizados (1-4). El día 49 corresponde a 10 días post-desafío de los cerdos (1-4) y 10 días post-contacto de los cerdos (5-6). El día 59 corresponde a los 10 días post-inoculación a los cerdos (5-6).

No se detectaron anticuerpos neutralizantes en los cerdos 5 y 6 durante el periodo de contacto con los animales inmunizados y desafiados. En contraste, tras la inoculación intradérmica del VFA en estos cerdos, a 10 días post-inoculación se detectaron títulos

muy altos de anticuerpos neutralizantes ($> 2,5$) (Tabla 6.5), similares a los determinados en los cerdos 7 y 8, controles de infección (datos no mostrados).

De igual manera, en los cerdos inmunizados (cerdos 1 a 4) se detectaron IgGs específicas frente al VFA a los 14 días post-inmunización, aunque los valores fueron máximos tras la administración de la segunda dosis de péptido, el día 39. No se determinaron incrementos de IgGs en estos animales tras el desafío con el VFA (Tabla 6.5). Títulos similares de IgG1 e IgG2 se detectaron el día 21 post-inmunización en los cerdos 1 a 4. El título de ambos isótipos se incrementó considerablemente tras la administración de la segunda dosis de péptido, alcanzando títulos alrededor de los 3 log (Figura 6.5A).

Por el contrario, en los cerdos 5 y 6 solo se detectaron IgGs tras la inoculación del VFA, pero no durante el periodo de contacto. En estos animales el perfil de isótipos detectados a los 10 días post-inoculación fue similar al observado en los cerdos inmunizados con el dendrímero (Figura 6.5B).

La inhalación por vía aerógena del VFA es considerada la ruta natural más común de transmisión de este virus. Por ello decidimos examinar el efecto en la respuesta IgA local y sistémica de la inmunización con el dendrímero B₄T.

Remarcable es el hecho de que la inmunización con el dendrímero fue capaz de inducir una fuerte respuesta sistémica de IgAs específicas (Figura 6.6). Tres de los cuatro cerdos inmunizados presentaron ya el día 21, tras la administración de una sola dosis de péptido, títulos de IgAs alrededor de 2 log. Estos títulos se incrementaron significativamente tras la administración de la segunda dosis de péptido, alcanzando el día 39 (día en el que los animales se desafían) valores superiores (Figura 6.6A) a los detectados en los cerdos 5 y 6 a los 10 días post-inoculación (Figura 6.6B).

También se encontraron IgAs específicas en los hisopos nasales de los cerdos inmunizados con el dendrímero B₄T (Figura 6.6A). Esta respuesta en mucosas se asoció a títulos significativos de actividad neutralizante detectada en los fluidos nasales (Tabla 6.5). Tras el desafío viral de los cerdos inmunizados, la respuesta de IgA se mantuvo estable sin incrementarse los títulos. Sin embargo, los títulos de IgAs en mucosas si se incrementaron de forma considerable tras la inoculación del VFA (Figura 6.6A).

En los dos cerdos contacto (cerdos 5 y 6) sólo se detectaron títulos de IgAs específicas frente al VFA después de la inoculación, siendo los títulos en mucosas muy similares en magnitud a los observados en los animales inmunizados (Figura 6.6B).

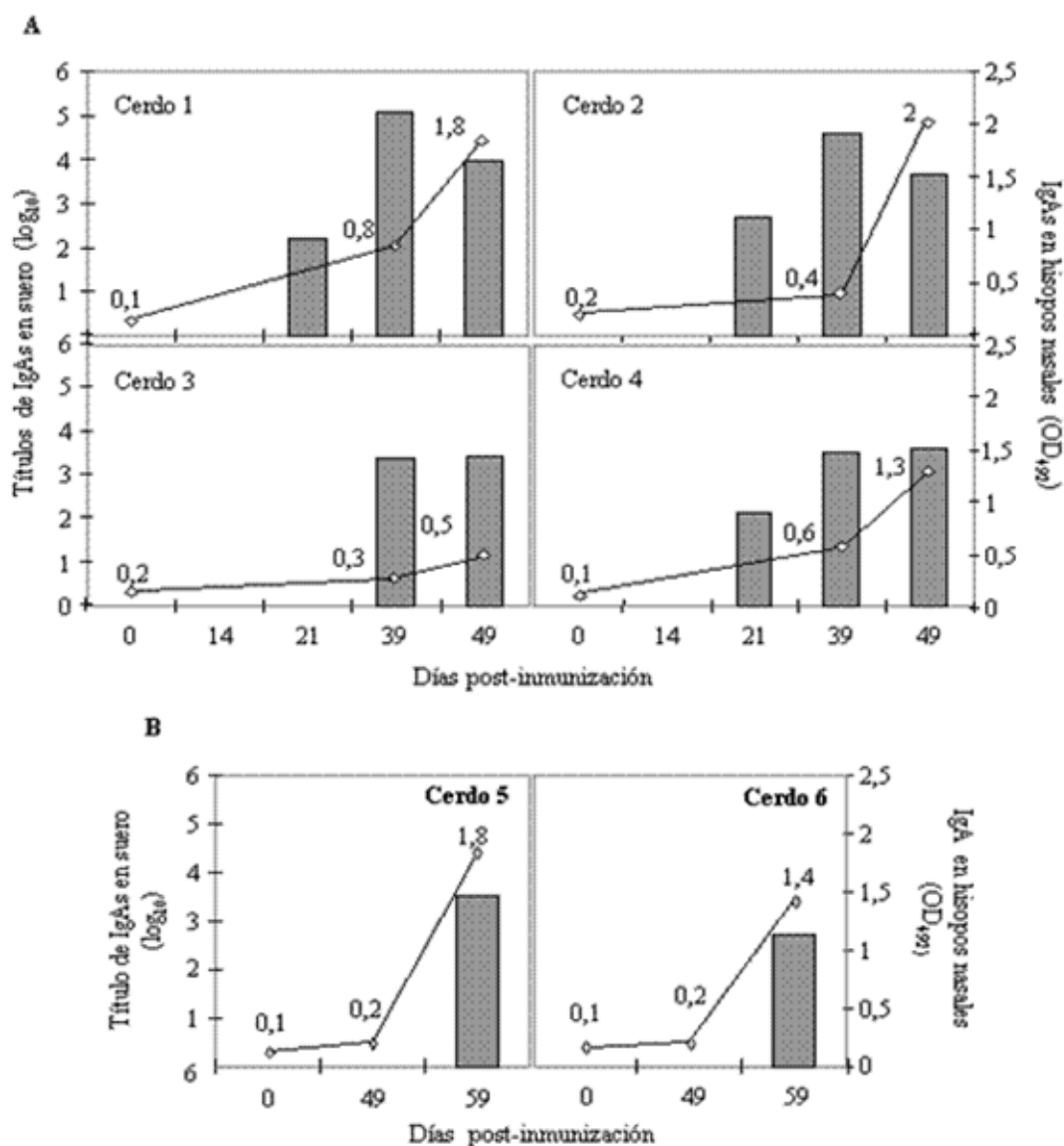


Fig. 6.6- Respuesta IgA, local y sistémica. Las barras corresponden a los resultados obtenidos de suero y las líneas (círculos) a los hisopos nasales. La Fig. 6.6(A), muestra los resultados obtenidos en diferentes tiempos después de la inmunización de los cerdos vacunados(1-4) y, la Fig. 6.6(B), enseña los datos de los animales (5-6) antes y después del contacto con los inmunizados (1-4). La obtención de los títulos de IgA de sueros se realizó de la misma manera que los IgG1 e IgG2 (descritos en la leyenda de la Fig. 6.5). Los títulos de IgA de hisopos nasales están expresados en (\log_{10}) correspondiente a la DO de una longitud de onda de A_{492} obtenida de la muestra diluida 1 /10.

6.2.5- RESPUESTA INMUNE CELULAR INDUCIDA POR EL DENDRÍMERO B₄T

Al igual que en el apartado 6.1.4, la respuesta inmune linfoproliferativa inducida en los cerdos inmunizados, en este caso con el péptido dendrimérico, se valoró estimulando *in*

vitro CMSP con el péptido B₄T y el virus. El estudio temporal de la respuesta linfoproliferativa se realizó recogiendo las CMSP los días 0 (antes de la inmunización), 21 y 39 post-inmunización, así como 10 días post-desafío con el VFA.

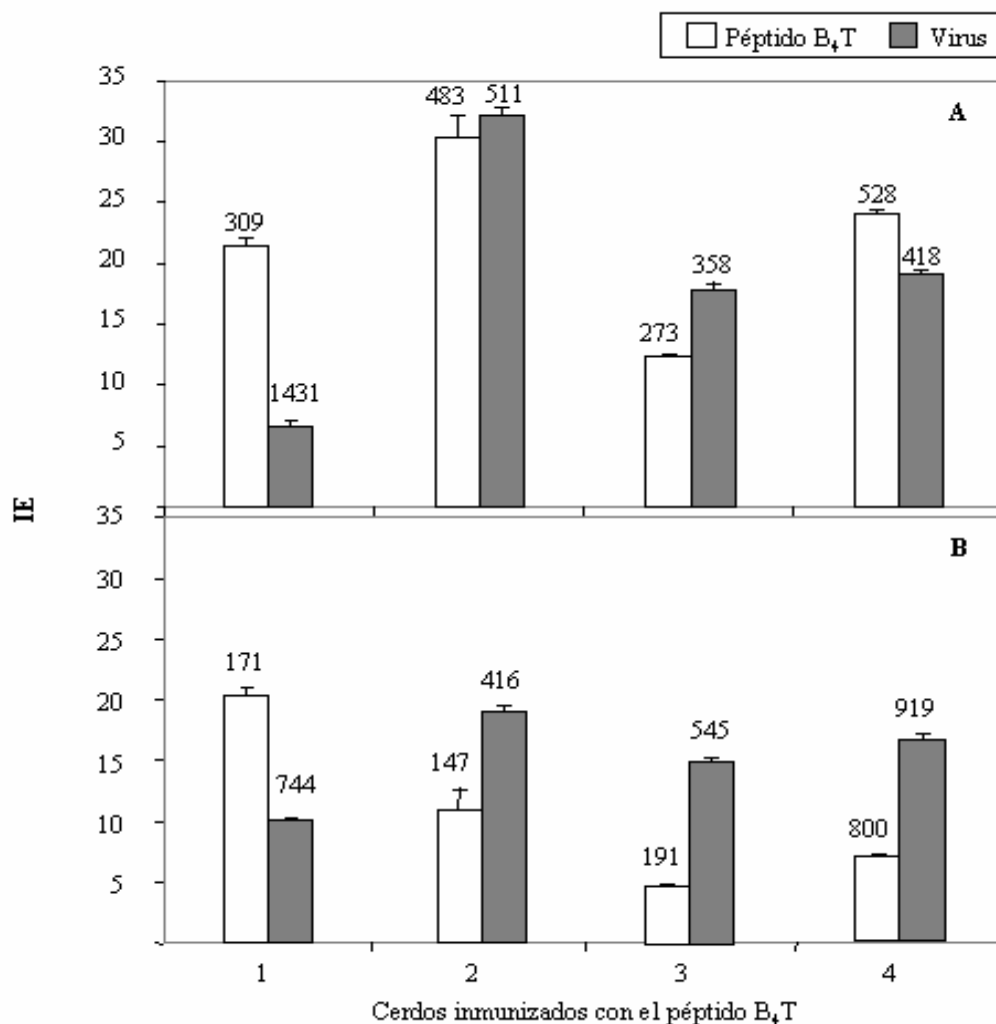


Fig. 6.7- Respuesta linfoproliferativa. Las barras muestran los resultados obtenidos de la linfoproliferación de CMSP recogidas el día 39 (día del desafío) Fig. 6.7(A) y a 49 (10 días post-infección) Fig. 6.7(B). Los valores corresponden a las cpm obtenidos de cultivos control. Los estímulos usados fueron: el dendrímero B₄T (20 µg / ml) y el virus VFA C-S8c1 (10₅ TCID₅₀ / ml). Los datos se expresan como IE (descritos en materiales y métodos apartado 5.2.5.1), con sus respectivas desviaciones standard.

No se detectaron respuestas linfoproliferativas significativas (IE > 2) frente a ninguno de los estímulos utilizados antes de la inmunización. El día 21 post-inmunización, comienza a ser detectable una respuesta específica frente a péptido y a diferencia de lo que sucedía en la inmunización con péptidos lineales también frente a virus, aunque con IE bajos (< 4). La respuesta linfoproliferativa fue óptima (IE máximos) frente a péptido B₄T y virus el día 39 post-inmunización (18 días post-boost) (Figura 6.7). Este día

todos los cerdos respondieron a la estimulación *in vitro* con el péptido B₄T, con IE entre 12 y 30 (Figura 6.7A). Estas respuestas fueron dependientes de dosis y los valores máximos se obtuvieron con concentraciones de péptido de 25 µg / ml, aunque estimulando con concentraciones de 10µg / ml aun fue posible detectar IE significativos en los cuatro animales (datos no mostrados).

La respuesta linfoproliferativa frente al VFA fue también elevada el día 39 post-inmunización. Las CMSP de todos los animales fueron capaces de responder de forma específica frente a la restimulación *in vitro* con el VFA, induciendo IE que oscilaron entre 6,6 y 32 (Figura 6.7A). Los IE máximos frente a virus se obtuvieron estimulando *in vitro* con concentraciones de VFA de 2×10^5 pfu por pocillo. Estos IE frente al VFA fueron significativamente superiores a los obtenidos con células de los cerdos inmunizados con péptidos lineales (Figura 6.3).

Tras el desafío viral siguió detectándose una respuesta linfoproliferativa significativa frente a los dos antígenos, péptido B₄T y el virus. En este caso, los valores de los IE obtenidos fueron en general ligeramente inferiores a los detectados antes del desafío (Figura 6.7B).

No hubo respuesta linfoproliferativa frente a los péptidos o el virus, en los dos cerdos contacto 5 y 6, ni antes ni después del desafío (datos no mostrados).

En sobrenadantes de las CMSP estimuladas con el péptido y con virus se valoró además la producción de dos citoquinas; IFN-γ e IL-10 (Fig.6.8). La producción de una citoquina Th1 como es el IFN-γ se detectó en los ensayos realizados con células recogidas el día 39 post-inmunización, reestimuladas *in vitro* con el dendrímero B₄T, pero no en células sin estimular (Figura 6.8A). Los niveles altos de IFN-γ producidos correlacionaron con la respuesta linfoproliferativa, de modo que son altos tras la inmunización péptidos pero disminuyen tras el desafío con virus. Una producción de IFN-γ por encima de 70 pg / ml se detectó con células de los cerdos 1, 2 y 4, el día 39 post-inmunización. La liberación de IFN-γ en estos cerdos tras el desafío disminuyó a valores entre 12,6 y 24,3 pg / ml (Figura 6.8A). Las células del cerdo 3 son las que liberaron menor cantidad de IFN-γ tras la inmunización (15 pg / ml), mientras que su producción se anuló completamente tras el desafío (Figura 6.8A).

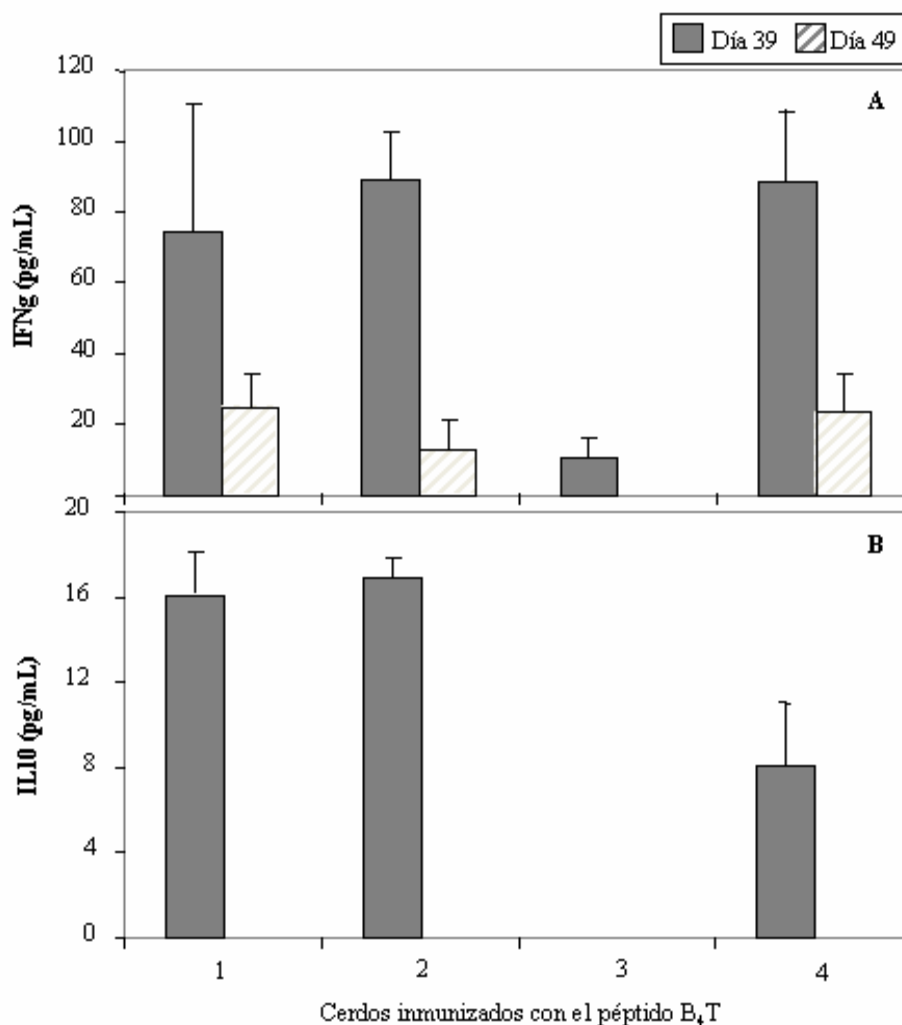


Fig. 6.8- Respuesta de citoquinas. Las barras de la Fig. 6.8(A) muestran los resultados obtenidos de IFN- γ y la Fig. 6.8(B) los conseguidos de IL-10. Estos datos corresponden a los sobrenadantes de cultivo de CMSP de los cerdos inmunizados (1-4) estimulados con el dendrímero B₄T (20 μ g / ml) durante 48h y 72h de incubación. Los valores se muestran en (pg / ml) y se detectaron por ELISA IFN- γ ó IL-10 (descritos en Materiales y Métodos 5.2.5.2). Los valores obtenidos con ambas citoquinas de los sobrenadantes control (no estímulo, solo medio) no fueron detectables.

La producción de IL-10 sin embargo, se detectó por encima del nivel de sensibilidad del ensayo solo con células de los cerdos 1 y 2, el día 39 post-inmunización (Figura 6.8B). Este patrón de citoquinas detectado, sugiere que el dendrímero B₄T es capaz de inducir una respuesta celular T específica frente al VFA, que cuando es reestimulado *in vitro* induce una respuesta dominante Th1.

6.2.6- INMUNIZACIÓN CON EL DENDRÍMERO B₄T PERMITE DIFERENCIAR ANIMALES INFECTADOS Y VACUNADOS

Con objeto de evaluar si la inmunización con el dendrímero B₄T inducía una respuesta de anticuerpos diferenciable de la desarrollada en animales infectados, suero de los cerdos 1 a 4 recogidos los días 39 (post-inmunización) y 49 (10 días post-desafío), se analizaron mediante ELISA para detectar la presencia de anticuerpos frente a la proteína 3ABC, proteína no estructural del VFA. Ninguno de estos sueros analizados resultó positivo. Sin embargo, en los cerdos 5 y 6 en los que no se detectó respuesta humoral frente a la proteína 3ABC durante el periodo de contacto, si se detectaron títulos significativos después de la inoculación con el VFA (Tabla 6.4), similares a los detectados en los cerdos 7 y 8, controles de infección (datos no mostrados).

7. DISCUSION

DESARROLLO DE VACUNAS PEPTÍDICAS FRENTE AL VFA.

Para aquellos sistemas virales, como el VFA, de los que se dispone de información precisa sobre la localización de los sitios antigénicos, es posible abordar la construcción de vacunas basadas en la utilización de péptidos sintéticos correspondientes a dichos sitios (Atassi y Webster, 1983). La FA sigue siendo una enfermedad de gran importancia en todo el mundo, donde son frecuentes los brotes en zonas no endémicas, procedentes de zonas donde la enfermedad si es endémica. Es el caso de los brotes de FA de Marruecos en 1999, Japón en el 2000 o los de Gran Bretaña y Holanda en el 2001. Por ello, el desarrollo de nuevas vacunas frente al VFA es un objetivo de gran importancia práctica.

Como ya se ha mencionado en el apartado 3.2.3.3. de la Introducción de esta Tesis, el uso de péptidos sintéticos como estrategia de control presenta ventajas adicionales a las compartidas con otras vacunas de subunidades (seguridad, precisión y posibilidad de diferenciar animales infectados y vacunados). Entre ellas destacan su fácil almacenamiento, transporte y distribución, además, de su fácil análisis y caracterización. Otra importante ventaja de estas vacunas es la posibilidad de modificar rápidamente la formulación o secuencia de los péptidos, ya que su síntesis es sencilla y está automatizada (Van der Burg S y cols, 2006), lo que permite su rápida adaptación a los cambios antigénicos detectados en los aislados virales causantes de brotes. Esto es de gran interés para virus como el VFA, muy heterogéneos antígenicamente como consecuencia de la estructura genética de *cuasiespecies* de sus poblaciones (Domingo y Holland, 1992).

Sin embargo, y a pesar del enorme potencial de esta estrategia de vacunación, el desarrollo de vacunas peptídicas eficaces hasta el momento se ha visto limitado por dificultades asociadas sobre todo a la estabilidad *in vivo* y a la baja inmunogenicidad de los péptidos sencillos, así como a la variabilidad determinada por el polimorfismo del MHC en los hospedadores (Tam, 1996).

Avances recientes están permitiendo desarrollar estrategias con las que superar dichos inconvenientes, lo que está devolviendo a las vacunas peptídicas al frente del diseño de

nuevas vacunas. De hecho, ya existen para uso humano algunas en estadios avanzados de desarrollo, investigadas por empresas como Pfizer, Novartis o Sanofi Pasteur (Purcell y cols, 2007).

En el campo de la medicina veterinaria, la primera vacuna peptídica efectiva desarrollada fue frente al parvovirus canino (Langeveld y cols, 1994). Esta vacuna consistió en la utilización de dos péptidos solapantes que reproducían el extremo amino terminal de la proteína VP2 del virus, capaces de conferir protección idéntica a la inducida por las vacunas inactivadas convencionales.

Más esfuerzos se han invertido en el desarrollo de una vacuna sintética frente al VFA, no existiendo aún una alternativa al uso de las vacunas clásicas inactivadas. Desde que Strohmaier y cols, (1982) identificaron la región [140-160] de VP1 como uno de los principales sitios antigénicos (sitio A), muchos grupos han centrado su estudio en la capacidad de esta región para inducir una respuesta protectora, con el fin de poder desarrollar una vacuna sintética que sustituya a las vacunas actuales.

La estructura antigénica del sitio A puede ser reproducida empleando péptidos sintéticos, como se ha demostrado experimentalmente con secuencias correspondientes a varios serotipos del virus. Bittle y cols, (1982) y Pfaff y cols, (1982), demostraron que un péptido que representa la zona [140-160] inducía en conejos y cobayas niveles de Acs neutralizantes superiores a los conseguidos con construcciones basadas en la totalidad de la VP1 (Kleid y cols, 1981), aunque inferiores a los conseguidos inmunizando con cantidades equivalentes de virus completo.

Diversas estrategias se utilizaron posteriormente en un intento por incrementar la inmunogenicidad de dichos péptidos. DiMarchi y cols, (1986) fueron los primeros en inmunizar bovinos, utilizando un péptido sintético que incluía en su formulación el péptido [140-160] enlazado a través de los aminoácidos Pro-Pro-Ser, al péptido [200-213], correspondiente a otra región de VP1 inmunogénica. Este péptido mostró cierta eficacia frente al VFA, aunque significativamente inferior a la vacuna convencional basada en virus inactivado. Resultados similares se obtuvieron cuando la región [140-160] se sintetizó como parte de la proteína del núcleo (core) del virus de la hepatitis B (Clarke y cols, 1987).

Más tarde Taboga y col., 1997, realizaron experimentos de inmunización a gran escala en bovinos, utilizando distintos péptidos sintéticos que reproducían epítopos localizados en la proteína estructural VP1: i) el sitio A (péptido A); ii) el sitio A unido a un epítipo T identificado en VP1 [21-40] (Collen y cols, 1991) (péptido AT); iii) los sitios A y C

(péptido AC) y iv) los sitios A, C y T (péptido ACT). En promedio, los valores de protección fueron del 29% de los animales desafiados, alcanzándose los mayores niveles de protección entre aquellos animales vacunados con el péptido ACT (39%).

La baja inmunogenicidad de los péptidos ensayados hasta el momento puede deberse a muy diversas razones. Entre ellas destacan la vida media corta que dichos péptidos presentan en el organismo, y la falta de epítomos T cooperadores potentes y eficaces (Rowland, D, 2004).

Con estos antecedentes, en esta Tesis nos propusimos evaluar estrategias capaces de incrementar la inmunogenicidad y protección inducida por péptidos sintéticos que reproducen el sitio A. En concreto valoramos *in vivo* dos abordajes: i) la inclusión en la formulación de un epítomo T cooperador inmunodominante localizado fuera de la VP1 y ii) la presentación múltiple de un sitio antigénico en una estructura ramificada sintética (péptido dendrimérico).

Con objeto de obtener datos de interés práctico en el desarrollo de vacunas frente al VFA, como modelo de experimentación se utilizó el cerdo, ya que es hospedador natural del VFA además de una especie relevante en ganadería.

El epítomo T seleccionado para incluir en los péptidos sintéticos evaluados en esta Tesis como nuevas vacunas, se localiza entre las posiciones 21-35 de la proteína no estructural 3A del VFA (Blanco y cols, 2001). Este epítomo T se caracterizó previamente en nuestro laboratorio como un epítomo T inmunodominante (en cerdo), heterotípico y promiscuo (ampliamente reconocido en el contexto de alelos del SLA de clase II, frecuentemente representados en las poblaciones de cerdos naturales Landrace x Large White). Además, mediante ensayos *in vitro* pudimos demostrar la capacidad de este epítomo T para cooperar efectivamente con el epítomo B que reproduce el sitio A, y generar actividad neutralizante (Blanco y cols, 2001).

5.1.- LA INMUNIZACIÓN CON EL PEPTIDO LINEAL TB (3A [21-35]-VP1[136-154]) INDUCE PROTECCIÓN PARCIAL Y REDUCE LA EXCRECCIÓN DE VIRUS TRAS EL DESAFÍO.

La primera estrategia evaluada en esta Tesis para tratar de incrementar la inmunogenicidad de péptidos sencillos que reproducen el sitio A del VFA, consistió en incluir en la formulación del inmunógeno peptídico el epítomo T 3A [21-35]. La

inmunogenicidad y protección inducida frente al VFA por los péptidos lineales diseñados, incluyendo o no el epítipo T mencionado, se evaluó mediante la inmunización de 12 cerdos. Seis animales se inmunizaron con el péptido B (Grupo 1) y otros seis con el péptido TB (Grupo 2), incluyendo un tercer grupo de animales no inmunizados como grupo control de infección (Grupo 3).

Tanto el péptido TB como el B fueron capaces de inducir protección parcial frente al desafío con el VFA, caracterizada fundamentalmente por el retardo en la aparición de lesiones (de entre 2 y 3 días), la menor severidad de las mismas y la ausencia de temperatura corporal por encima de 41°C.

Entre los animales de los tres grupos también se produjeron diferencias significativas en cuanto a la generalización de la infección (aparición de aftas en las cuatro patas y el morro). Ninguno de los animales inmunizados con el péptido TB llegó a desarrollar infección generalizada, durante los 10 días posteriores al desafío en que los animales fueron monitorizados. Mientras que todos los animales control del grupo 3 y la mitad de los del grupo 1, inmunizados con péptido B, si desarrollaron lesiones generalizadas.

Siguiendo el sistema de cuantificación de lesiones clínicas descrito por Alexandersen y col., 2003, para las infecciones con el VFA, los animales inmunizados con el péptido TB registraron los valores más bajos (6,1), seguidos de los cerdos del grupo 1 inmunizados con el péptido B (8,4) y los cerdos control (9,6) (Figura 6.2).

Estos resultados indican por tanto, que aunque la inclusión del epítipo T en la formulación del péptido lineal no es capaz de inducir protección completa a la dosis utilizada, la clínica desarrollada en esos animales tras el desafío con el VFA es claramente mas benigna que en los animales no inmunizados o inmunizados solo con el epítipo B.

Además de la protección clínica, se analizó la viremia y la excreción de virus en fluidos nasales y faringeos, mediante análisis por RT-PCR de muestras tomadas a diferentes días tras el desafío. De las 48 muestras analizadas de cada grupo, sólo se detectó RNA del VFA en 4 de 3 de los cerdos inmunizados con el péptido TB, recogidas los días 3 y 7 post-infección. Sin embargo, el RNA viral se amplificó en 15 muestras de los cerdos inmunizados con el péptido B (recogidas a los 3 y 7 días post-infección) y en 23 de los animales control de infección (recogidas a los 3, 7 y 10 días post-infección) (Tabla 6.1). Estos datos muestran que los péptidos B y TB son capaces de reducir significativamente el tiempo tras el desafío en que el virus se excreta. Ninguna de las muestras recogidas a los 10 días post-infección de los cerdos inmunizados con dichos péptidos fue positiva.

Por el contrario, en los cerdos no inmunizados (Grupo 3), se sigue amplificando RNA viral en muestras recogidas a los 10 días post-infección, de 3 de los 4 cerdos.

La reducción de la excreción de virus en los cerdos inmunizados con péptido es aún más evidente en los animales del Grupo 2 (inmunizados con péptido TB). Sólo una de las muestras recogidas a los 7 días post-infección de los cerdos de este grupo resultó positiva por RT-PCR, mientras que 7 de las recogidas del Grupo 1 (cerdos inmunizados con el péptido B), lo fueron.

La transmisión del VFA puede realizarse por vía directa o indirecta, pero la transmisión por vía aerógena es probablemente la forma más frecuente de contagio (Alexandersen, S y cols, 2003). En la epidemiología de la FA los cerdos tienen un papel muy importante como “amplificadores” del virus. Son capaces de excretar por vía aerógena en forma de aerosoles gran cantidad de material infeccioso, lo que hace que sean en general los principales focos de transmisión de la enfermedad en las granjas (Alexandersen, S and Donaldson, A, 2002). Aunque no se ha evaluado en los experimentos realizados, es probable que la eficiencia mostrada principalmente por el péptido TB, para reducir la excreción de virus tras la infección con el VFA, implique una reducción del riesgo de transmisión viral a animales susceptibles, limitando así la expansión del virus.

Hemos observado que esta reducción de excreción viral tras el desafío detectada en los animales inmunizados con péptido, correlaciona con la severidad de las lesiones desarrolladas. Recientemente Parida S y cols, (2007) han descrito una correlación semejante, entre la reducción de replicación y excreción viral, inducida por una vacuna inactivada de emergencia (con mayor carga viral que las convencionales), y la severidad de la clínica desarrollada en los cerdos vacunados tras el desafío con el VFA.

La presencia de RNA del VFA también se analizó en distintas muestras biológicas recogidas en la necropsia. Al igual que en los análisis de sangre e hisopos, la presencia de RNA viral se detectó en un menor número de muestras de los cerdos inmunizados con el péptido B (11 muestras) y TB (8 muestras), que en los controles no inmunizados (19 muestras) (Tabla 6.2).

En definitiva, estos datos en conjunto sugieren que la inmunización con el péptido TB, aunque no proporciona una protección completa ni clínica ni virológica, si es capaz de reducir la severidad de la enfermedad y la excreción de virus, quizá favoreciendo la eliminación rápida del virus y/o limitando más eficiente de la replicación viral.

La respuesta humoral específica frente al VFA, primaria y anamnésica, desarrollada en los cerdos inmunizados con los péptidos B y TB se analizó determinando tanto el título de anticuerpos neutralizantes como el isótopo de los anticuerpos inducidos.

Ambos péptidos, B y TB fueron capaces de inducir en los cerdos inmunizados anticuerpos neutralizantes, que para alcanzar títulos significativos requirieron la administración de dos dosis vacunales. La magnitud de esta respuesta neutralizante fue similar en los dos grupos de animales, sin apreciarse diferencias significativas. Los títulos máximos alcanzados fueron del orden de 2 log. Tras el desafío con el VFA estos títulos se incrementaron alrededor de 1 log, hasta alcanzar títulos similares a los encontrados en los cerdos control del grupo 3. Este incremento del título de anticuerpos neutralizantes tras el desafío sugiere replicación viral, lo que correlaciona con el desarrollo de síntomas clínicos de FA en dichos animales.

La protección frente al VFA proporcionada por las vacunas inactivadas correlaciona bien con el título sérico de anticuerpos neutralizantes en vacas, y en menor medida en cerdos (Black. L y cols, 1984). La inmunización de cerdos con los péptidos B y TB a pesar de inducir títulos de anticuerpos neutralizantes considerados como protectivos (> 1,7), no han permitido conferir protección total frente al desafío con el VFA. La falta de correlación entre el título de anticuerpos neutralizantes y protección, conferidas por inmunógenos distintos al virus inactivado, ha sido descrito en diversas ocasiones (McCullough. K y Sobrino. F, 2004).

La neutralización de la capacidad de los viriones para infectar células susceptibles *in vitro* puede no ser el único parámetro funcional de la respuesta de anticuerpos frente al VFA responsable de la protección. Los anticuerpos pueden neutralizar el VFA al menos mediante tres tipos diferentes de mecanismos (Mateu. M y Verdaguer. N, 2004). La baja eficiencia biológica de los anticuerpos neutralizantes inducidos por los péptidos lineales utilizados podrían atribuirse a diferencias en el mecanismo de neutralización que utilizan o bien a diferencias en la afinidad. Además, ha de tenerse en cuenta, que junto con la neutralización directa de la infectividad viral, es posible que otros mecanismos de “clearance” viral pueden estar actuando *in vivo*, sin olvidar la potencial relevancia de los mecanismos de respuesta celular en la protección final frente al VFA.

Por ello, tras la inmunización de cerdos con los péptidos lineales B y TB descritos en esta Tesis, valoramos otros parámetros de la respuesta inmune.

Diferencias en los ratios de anticuerpos anti-VFA de isotipos IgG1/IgG2, inducidos en animales infectados y vacunados convencionalmente, versus los encontrados en

animales inmunizados con péptido, se han correlacionado con la falta de protección conferida por estos últimos (Mulcahy. G y cols, 1987; Taboga. O y cols, 1997). Los títulos de IgG1 específicas encontradas en los animales inmunizados tanto con péptido B como TB fueron similares, alrededor de 2,5 log, pero significativamente superiores a los encontrados en los animales infectados, que fueron en promedio de 1,5 log. Los títulos de IgG2 sin embargo fueron similares en todos los animales, al igual que los títulos de IgA. Tras el desafío los títulos de IgGs específicas se incrementan significativamente, mientras que los de IgA experimentaron solo un ligero incremento.

Por tanto, no parece encontrarse una correlación entre la protección parcial observada en los animales inmunizados con péptido y los isótipos de los anticuerpos anti-VFA encontrados en esos animales. Si se observan diferencias entre los animales inmunizados y los controles de infección, posiblemente reflejo del distinto patrón de citoquinas o de la expresión de determinadas moléculas co-estimuladoras, relevantes en la inducción del “switch” de los anticuerpos.

Como se ha mencionado varias veces a lo largo de esta Tesis, la respuesta celular puede ser clave en el desarrollo de una respuesta inmune eficiente capaz de proteger frente el VFA. Mediante ensayos de linfoproliferación esta respuesta fue valorada, estimulando *in vitro* CMSP de los cerdos inmunizados, con virus y péptidos.

La magnitud de la respuesta linfoproliferativa mostró variaciones individuales, de acuerdo con la utilización de un modelo animal abierto (“outbred”). Todos los animales inmunizados con péptido fueron capaces de responder con IE significativos (>3) a la estimulación *in vitro* con sus respectivos inmunógenos. Los IE máximos en los grupos 1 y 2 (inmunizados con péptidos B o TB), fueron de 40 y 105, respectivamente.

En la respuesta celular frente al VFA se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos de animales inmunizados con péptidos. Mientras que solo dos de los cerdos inmunizados con péptido B fueron capaces de reconocer el VFA, con IE bajos alrededor de 3, todos los cerdos inmunizados con el péptido TB excepto uno (cerdo 359) reconocieron el VFA (Figura 6.3).

Estos resultados sugieren una cierta correlación entre la magnitud de la respuesta linfoproliferativa frente a los péptidos y su respuesta frente al virus. Además, también se observa una clara correlación entre la respuesta linfoproliferativa frente al virus y la reducción de excreción viral tras el desafío, lo que en definitiva puede estar sugiriendo la implicación de algún mecanismo de respuesta celular en el control de la infección por VFA observada en los animales inmunizados con péptido.

5.2.- LA INMUNIZACIÓN CON EL PÉPTIDO DENDRIMÉRICO B₄T POTENCIA LA RESPUESTA IgA EN MUCOSAS Y CONFIERE PROTECCIÓN TOTAL FRENTE AL VFA EN CERDO.

La construcción de péptidos multiméricos, como la obtención de construcciones dendriméricas, ha sido reconocido como uno de los métodos más efectivos para incrementar la inmunogenicidad de los péptidos sencillos (Borrás-Cuesta.F y cols, 1988; Tam, 1996). En esta Tesis, se presentan por primera vez resultados de protección sólida frente al VFA en uno de sus hospedadores naturales, el cerdo, mediante la inmunización con un péptido dendrimérico que contiene un epítipo B y uno T del virus.

La inmunización de los animales por vía intramuscular con el péptido B₄T fue capaz de evitar la aparición de síntomas clínicos de FA y prevenir la transmisión de la enfermedad a animales contacto. Ninguno de los dos cerdos que se mantuvieron en contacto con los animales inmunizados durante el periodo de desafío de estos, mostró signos o síntomas clínicos de infección por VFA. Estos mismos animales sin embargo, desarrollaron una infección aguda generalizada, tras ser inoculados con el virus por vía intradérmica. El hecho de que no se detecte RNA viral ni en suero ni en fluidos nasales, así como la ausencia de leucopenia transitoria, asociada a la infección con el VFA (Díaz-San Segundo y cols, 2006), demostrada por la ausencia de inhibición de la respuesta linfoproliferativa frente a un mitógeno (Con A), en los animales inmunizados con el péptido B₄T (datos no mostrados), confirma que los niveles de replicación del virus en esos animales estuvieron por debajo de los necesarios para la transmisión del virus y la enfermedad.

Al igual que tras la inmunización con los péptidos lineales B y TB, la inmunización con el péptido dendrimérico B₄T fue capaz de inducir títulos de anticuerpos neutralizantes significativos, en magnitud considerada protectora. En este caso si encontramos correlación entre protección y el desarrollo de dichos anticuerpos. Como se ha mencionado ya en esta Discusión, la eficiencia final de los anticuerpos neutralizantes inducidos por los péptidos puede depender de los mecanismos de neutralización que medien o bien de la afinidad que presenten. En este caso, si bien la magnitud de la respuesta de anticuerpos neutralizantes desarrollada en respuesta al péptido dendrimérico es similar a la desarrollada tras la inmunización con péptidos lineales, es

posible que la presentación del epítipo B [VP1 136-154] en una estructura dendrímica, de lugar a cambios en la conformación de los péptidos que permitan un incremento de la afinidad de los anticuerpos neutralizantes inducidos, aunque sin incremento de título.

A diferencia de lo observado en la inmunización con los péptidos lineales, la inmunización con el péptido B₄T, es capaz de inducir títulos significativos de anticuerpos neutralizantes tras la administración de una sola dosis de inmunógeno. Aún así, la administración de la segunda dosis de dendrímero, induce una respuesta anamnésica capaz de incrementar los títulos de anticuerpos neutralizantes hasta alrededor de 2 log (títulos inferiores en aproximadamente 1 log, a los detectados en los cerdos inoculados con el VFA a los 10 días post-inoculación).

Los títulos de IgG1 e IgG2 inducidos por el péptido dendrímérico B₄T fueron similares a los detectados en los cerdos contacto tras la infección con el VFA, lo que sugiere que no hay diferencias significativas en cuanto al isótipo de los anticuerpos específicos inducidos por dicho péptido o por el virus.

Sin embargo, en lo que se refiere a la respuesta de IgAs específicas, es interesante destacar que la inmunización con el péptido dendrímérico B₄T fue capaz de inducir en tres de los cuatro cerdos estas inmunoglobulinas tan pronto como a los 21 días post-inmunización, y tras la administración de una sola dosis de vacuna. Esta respuesta de IgAs se incremento significativamente tras la administración de la segunda dosis de péptido, llegando a alcanzar títulos del orden de 4 y 5 log (cerdos 1 y 2) o algo inferiores para los cerdos 3 y 4 (títulos de entre 3 y 4 log, similares a los detectados en los cerdos control de infección). Estos títulos de IgAs fueron significativamente superiores a los inducidos por los péptidos lineales, tanto B como TB.

Es destacable que IgAs específicas se induzcan también en muestras nasales de tres de los cuatro cerdos inmunizados con el péptido B₄T, antes del desafío con el VFA. Tras el desafío viral, los títulos de IgAs en hisopos nasales se incrementaron en los cuatro cerdos inmunizados, alcanzando valores similares a los determinados en los cerdos contacto infectados.

En contraste con otras vacunas que requieren de administración en mucosas para acceder a la vía natural de inducción de este tipo de respuesta, el péptido dendrímérico B₄T fue capaz de inducir una respuesta de mucosas potente, tras su administración por vía parenteral. Diferentes mecanismos, no exclusivos, se han propuesto para explicar la producción de anticuerpos secretores después de la administración de antígenos por vía

parenteral, incluyendo la difusión directa de antígenos solubles o fagocitados a los tejidos asociados a mucosas, o la activación de células presentadoras de antígeno en los ganglios linfáticos encargados de drenar los antígenos, y su posterior migración a tejidos linfoides asociados a mucosas (Bouvet. J y cols, 2002). En cualquiera de los supuestos, la administración parenteral de antígenos capaces de inducir una respuesta inmune de mucosas potente, como es el caso de nuestro péptido dendrimérico B₄T y algunos otros pocos inmunogenos descritos hasta el momento (Guthrie. T y cols, 2004; Musey. L, 2003; Thompson. J y cols, 2006), constituye un abordaje interesante y alternativo a los convencionales, para el desarrollo de futuras vacunas de mucosas. Estas de administración parenteral, podrían solventar algunos de los inconvenientes o problemas asociados a la administración de inmunogenos por la vía de mucosas, como la degradación local o la física expulsión de la vacuna, que impide controlar la dosis administrada.

El desafío de los animales utilizado en los experimentos realizados en el transcurso de esta Tesis, por inoculación intradérmica del VFA , se seleccionó de acuerdo con los requerimientos descritos para evaluar la potencia de vacunas frente al VFA (Salt. J y cols, 1996). La correlación encontrada entre protección sólida y títulos altos de IgAs específicas inducidas por el péptido dendrimérico B₄T, nos hace pensar que podría ser interesante evaluar la protección conferida por este péptido, tras un desafío con VFA por vía respiratoria, que es la ruta de transmisión de este virus más probable en el campo.

El papel funcional en protección, de la respuesta celular T inducida por el VFA, y el balance de citoquinas producidas, es algo que aun no está bien establecido (Barnard. A y cols, 2005). La inmunización con el péptido B₄T indujo células T, capaces de proliferar de modo consistente, cuando se estimularon *in vitro* con el péptido y con el virus. Tras el desafío viral, mientras que la respuesta linfoproliferativa frente al péptido se redujo en tres de los cuatro animales inmunizados, la proliferación frente al virus se mantuvo constante. Esto sugiere que la inmunización con el péptido B₄T prima *in vivo* células T capaces de reconocer epítomos virales presentados en el contexto de la articulación viral. La estimulación *in vitro* con el péptido, hace que esas células T primadas *in vivo* liberen IFN γ y en menor medida IL-10. El IFN γ es el principal activador de macrófagos, potenciando su actividad microbicida y su capacidad para procesar y presentar antígenos a los linfocitos T. En el cerdo, la mayoría de las células productoras de IFN γ son linfocitos T $\alpha\beta$, y dentro de ellos la mayoría son de la subpoblación doble positiva

CD4+CD8+, que incluye los linfocitos T de memoria (Rodríguez-Carreño. M, y cols, 2002). Se ha descrito que el IFN γ es capaz de estimular la expresión de moléculas del MHC en las células presentadoras de antígeno y de inhibir eficientemente la replicación del VFA (Zhang. Z y cols, 2002). En conjunto todos estos resultados sugieren que las células T porcinas primadas por el dendrímero B₄T inducen una activación celular T que eficientemente contribuye a la protección frente al VFA.

Se han descrito variaciones individuales en la respuesta protectora inducida por vacunas peptídicas, inclusive frente al VFA (Collen. T y cols, 1991; Taboga. O y cols, 1997), que se han asociado con la restricción impuesta por el MHC en el reconocimiento de epítomos T (García - Briones M y cols, 2000). Es interesante destacar que a pesar de las diferencias en las respuestas B y T desarrolladas en los cuatro cerdos de este estudio, todos ellos se protegieron frente al desafío con el VFA, lo que sugiere que el dendrímero utilizado es capaz de inducir respuesta B y T lo suficientemente efectivas para evitar la replicación del virus y minimizar la posibilidad de selección de variantes virales de escape (Taboga. O y cols 1997).

Los mecanismos que conducen a la protección sólida conferida por el péptido dendrimérico B₄T, esta aún por conocer en detalle. Los péptidos lineales utilizados en la primera parte de esta Tesis, y que incluían también epítomos B y T del VFA, fueron capaces de inducir solo protección parcial frente al VFA e indujeron niveles significativamente más bajos de IgAs específicas sistémicas que los observados tras la inmunización con el péptido B₄T. Esto sugiere que o bien la presentación del epítomo B en forma de construcción dendrímica o la inclusión del epítomo T separado de las ramas de epítomos B mediante la inclusión de un sitio de corte reconocido por la cathepsina D, o ambos, pueden ser relevantes para inducir la respuesta de anticuerpos observada. Así mismo, se ha demostrado el papel en protección frente al VFA de epítomos T específicos de este virus, en animales inmunizados con virus vaccinia recombinantes que expresaban proteínas del VFA en ausencia de los sitios antigénicos B presentes en la cápsida viral (García - Briones M y cols, 2004).

La diferenciación entre animales vacunados e infectados es de gran interés fundamentalmente para monitorizar la circulación de virus y evitar las restricciones en el movimiento de animales o productos de origen animal, desde países en los que se vacuna frente al VFA, a aquellos en los que no se vacuna. Este es uno de los puntos más controvertidos en el control de enfermedades animales y muy especialmente en lo que se refiere a la FA (Pasick. J, 2004). Es digno de destacar que el péptido dendrimérico

analizado en esta Tesis, es capaz de inducir una respuesta serológica compatible con la utilización de los ensayos disponibles para diferenciar animales vacunados de infectados, ya no induce anticuerpos frente a la proteína no estructural 3ABC, parámetro habitualmente utilizado para diagnosticar replicación del VFA (Brocchi E y cols, 2006). El número de animales utilizado para valorar la inmunogenicidad y protección del dendrímero B₄T es el normalmente utilizado para los análisis preliminares de otros candidatos vacunales, aunque no sea el suficiente para una demostración estadística de su eficacia. A pesar de ello, los resultados obtenidos son lo suficientemente sólidos como para demostrar que la inmunización con esta construcción dendrimerica es capaz de inducir en cerdo una respuesta inmune similar a la inducida en animales control tras la infección con el VFA. Esta respuesta se asocia no solo con la prevención clínica de la enfermedad, además inhibe la replicación local del virus y la transmisión por vía aerógena, la excreción del VFA. En definitiva estos resultados señalan a los péptidos dendrimericos como un abordaje interesante en el desarrollo y mejora de las vacunas de subunidades basadas en la utilización de péptidos.

8. CONCLUSIONES

1.- La inmunización de cerdos con los péptidos lineales B [VP1 136-154] y TB ([VP1 136-154/ 3A[21-35]]) induce protección parcial frente al desafío con el VFA, caracterizada por un retardo en la aparición de lesiones y una menor severidad de las mismas, en comparación con la clínica observada en cerdos no inmunizados.

2.- Ninguno de los animales inmunizados con el péptido lineal TB ([VP1 136-154/ 3A[21-35]]) llegó a desarrollar infección generalizada por el VFA, mientras que la mitad de los cerdos inmunizados con el péptido B [VP1 136-154] si lo hicieron.

3.- En los cerdos inmunizados con el péptido TB y en menor medida con el B, la excreción de virus tras el desafío se redujo significativamente, lo que probablemente implique una disminución del riesgo de transmisión del virus a animales susceptibles.

4.- La reducción de virus excretado tras el desafío, detectado en los animales inmunizados con los péptidos lineales correlaciona con la severidad de la clínica desarrollada en los mismos.

5.- En definitiva, aunque la inmunización con el péptido TB no proporciona una protección completa ni virológica ni clínica, este péptido si es capaz de reducir la excreción de virus tras el desafío y la severidad de la enfermedad.

6.- La inmunización con los péptidos lineales B y TB induce títulos de anticuerpos neutralizantes significativos (>1.7 log) lo que requiere administrar dos dosis de inmunógeno.

7.- El título de anticuerpos neutralizantes en los animales inmunizados con los péptidos lineales, se incrementa aproximadamente 1 log tras el desafío, lo que sugiere replicación viral.

8.- No se observa pues correlación entre protección y título de anticuerpos neutralizantes, en los cerdos inmunizados con péptidos lineales.

9.- Los ratios de anticuerpos específicos anti-VFA de isotipos IgG1/IgG2, así como las IgAs, fueron similares en los animales inmunizados con el péptido B y con el péptido TB.

10.- Las CMSP de los cerdos inmunizados con los péptidos lineales fueron capaces de responder con IE significativos (>3) a la estimulación *in vitro* con los respectivos péptidos.

11.- La inmunización con el péptido dendrimérico B₄T, confiere protección completa, evitando la aparición de síntomas clínicos de FA y previniendo la transmisión de la enfermedad a cerdos contacto.

12.- No se detectó RNA viral en los sueros y fluidos nasales recogidos de los cerdos inmunizados con el péptido dendrimérico B₄T y desafiados. Esto junto con la ausencia de leucopenia demostrada por la no inhibición de la respuesta linfoproliferativa tras el desafío, parece indicar que los niveles de replicación del virus en esos animales se controlaron a niveles por debajo de los necesarios para la transmisión del virus y la enfermedad.

13.- La inmunización con el péptido dendrimérico, fue capaz de inducir títulos de anticuerpos neutralizantes frente al VFA significativos (>1.7 log), tras la administración de una sola dosis de inmunógeno.

14.- Los ratios de anticuerpos específicos anti-VFA de isotipos IgG1/IgG2, en los animales inmunizados con el péptido dendrimérico B₄T, fueron similares a los detectados en los cerdos infectados.

15.- La inmunización con el péptido dendrimérico B₄T fue capaz de inducir títulos muy elevados de IgAs frente al VFA, sistémicas y locales, a pesar de haberse administrado por vía intramuscular.

16.- La inmunización con el péptido B₄T indujo células T, capaces de proliferar de modo consistente, cuando se estimularon *in vitro* con el péptido y con el virus.

17.- La respuesta linfoproliferativa frente al VFA tras el desafío no disminuye, mientras que frente al péptido sí, lo que parece indicar que la inmunización con el dendrímero utilizado es capaz de primar células T capaces de reconocer epítomos virales presentados en el contexto de la partícula viral.

18.- La estimulación *in vitro* con el péptido B₄T, hace que esas células T primadas *in vivo* liberen IFN γ y en menor medida IL-10

19.- La inmunización con el péptido dendrimérico B₄T es capaz de inducir una respuesta serológica compatible con la utilización de los ensayos disponibles para diferenciar animales vacunados de infectados, por lo que constituye un vacuna marcada.

9. BIBLOGRAFIA

1. **Abbas, A., A. Litchman, and J. Pober.** 1991. Antigen presentation and T cell antigen recognition, p. 115-137. *In* M. J. Wonsiewwicz (ed.), Cellular and molecular immunology. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
2. **Abbas, A., A. Litchman, and J. Pober.** 1991. B cell activation and antibody production, p. 186-203. *In* M. J. Wonsiewwicz (ed.), Cellular and molecular immunology. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
3. **Abbas, A., A. Litchman, and J. Pober.** 1991. Cytokines, p. 113-134. *In* M. J. Wonsiewwicz (ed.), Cellular and molecular immunology. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
4. **Acharya, R., E. Fry, D. Stuart, G. Fox, D. Rowlands, and F. Brown.** 1989. The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature* **337**:709-16.
5. **Ahl, R., B. Hass, R. Lorenz, and G. Wittman.** 1990. Alternative potency test of FMDV vaccines and results of comparative antibody assays in different cell systems and ELISA, p. 51-60. *In* F. a. a. o. (FAO) (ed.), Report of the session of the research group of the standing technical. Committee of the European commission for the control of foot and mouth disease Lindholm.
6. **Alexandersen, S., and A. I. Donaldson.** 2002. Further studies to quantify the dose of natural aerosols of foot-and-mouth disease virus for pigs. *Epidemiol Infect* **128**:313-23.
7. **Alexandersen, S., M. Quan, C. Murphy, J. Knight, and Z. Zhang.** 2003. Studies of quantitative parameters of virus excretion and transmission in pigs and cattle experimentally infected with foot-and-mouth disease virus. *J Comp Pathol* **129**:268-82.
8. **Amadori, M., I. L. Archetti, R. Verardi, and C. Berneri.** 1992. Isolation of mononuclear cytotoxic cells from cattle vaccinated against foot-and-mouth disease. *Arch Virol* **122**:293-306.
9. **Atassi, M. Z., and R. G. Webster.** 1983. Localization, synthesis, and activity of an antigenic site on influenza virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**:840-4.
10. **Bachmann, M. F., and G. T. Jennings.** 2004. Virus - like particles, combining innate and adaptative immunity for effective vaccination, p. 411-428. *In* S. H. E. Kaufmann (ed.), Novel vaccination strategies, Weinheim.
11. **Bachrach, H. L.** 1981. Visualization by chilling of protein bands in polyacrylamide gels containing 8 M urea: preparation and quantitation of foot-and-mouth disease virus capsid proteins. *Anal Biochem* **110**:349-54.
12. **Bailey, M., B. G. Miller, E. Telemo, C. R. Stokes, and F. J. Bourne.** 1993. Specific immunological unresponsiveness following active primary responses to proteins in the weaning diet of piglets. *Int Arch Allergy Immunol* **101**:266-71.
13. **Barnard, A. L., A. Arriens, S. Cox, P. Barnett, B. Kristensen, A. Summerfield, and K. C. McCullough.** 2005. Immune response characteristics following emergency vaccination of pigs against foot-and-mouth disease. *Vaccine* **23**:1037-47.
14. **Barteling, S. J., and J. Vreeswijk.** 1991. Developments in foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine* **9**:75-88.
15. **Beard, C., G. Ward, E. Rieder, J. Chinsangaram, M. J. Grubman, and P. W. Mason.** 1999. Development of DNA vaccines for foot-and-mouth disease,

- evaluation of vaccines encoding replicating and non-replicating nucleic acids in swine. *J Biotechnol* **73**:243-9.
16. **Beck, E., and K. Strohmaier.** 1987. Subtyping of European foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. *J Virol* **61**:1621-9.
 17. **Ben-Yedidia, T., and R. Arnon.** 1997. Design of peptide and polypeptide vaccines. *Curr Opin Biotechnol* **8**:442-8.
 18. **Berry, J. M., and J. M. Palefsky.** 2003. A review of human papillomavirus vaccines: from basic science to clinical trials. *Front Biosci* **8**:s333-45.
 19. **Bittle, J. L., R. A. Houghten, H. Alexander, T. M. Shinnick, J. G. Sutcliffe, R. A. Lerner, D. J. Rowlands, and F. Brown.** 1982. Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature* **298**:30-3.
 20. **Black, L., M. J. Francis, M. M. Rweyemamu, O. Umebara, and A. Boge.** 1984. The relationship between serum antibody titres and protection from foot and mouth disease in pigs after oil emulsion vaccination. *J Biol Stand* **12**:379-89.
 21. **Blanco, E., M. Garcia-Briones, A. Sanz-Parra, P. Gomes, E. De Oliveira, M. L. Valero, D. Andreu, V. Ley, and F. Sobrino.** 2001. Identification of T-cell epitopes in nonstructural proteins of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **75**:3164-74.
 22. **Blanco, E., K. McCullough, A. Summerfield, J. Fiorini, D. Andreu, C. Chiva, E. Borrás, P. Barnett, and F. Sobrino.** 2000. Interspecies major histocompatibility complex-restricted Th cell epitope on foot-and-mouth disease virus capsid protein VP4. *J Virol* **74**:4902-7.
 23. **Blanco, E., L. J. Romero, M. El Harrach, and J. M. Sanchez-Vizcaino.** 2002. Serological evidence of FMD subclinical infection in sheep population during the 1999 epidemic in Morocco. *Vet Microbiol* **85**:13-21.
 24. **Boothroyd, J. C., T. J. Harris, D. J. Rowlands, and P. A. Lowe.** 1982. The nucleotide sequence of cDNA coding for the structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *Gene* **17**:153-61.
 25. **Borrás-Cuesta, F., Y. Fedon, and A. Petit-Camurdan.** 1988. Enhancement of peptide immunogenicity by linear polymerization. *Eur J Immunol* **18**:199-202.
 26. **Borrego, B., P. Fernandez-Pacheco, L. Ganges, N. Domenech, N. Fernandez-Borges, F. Sobrino, and F. Rodriguez.** 2006. DNA vaccines expressing B and T cell epitopes can protect mice from FMDV infection in the absence of specific humoral responses. *Vaccine* **24**:3889-99.
 27. **Bouvet, J. P., N. Decroix, and P. Pamonsinlapatham.** 2002. Stimulation of local antibody production: parenteral or mucosal vaccination? *Trends Immunol* **23**:209-13.
 28. **Brandtzaeg, P.** 2007. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine* **25**:5467-84.
 29. **Brewer, J. M., and J. Alexander.** 1997. Cytokines and the mechanisms of action of vaccine adjuvants. *Cytokines Cell Mol Ther* **3**:233-46.
 30. **Brocchi, E., I. E. Bergmann, A. Dekker, D. J. Paton, D. J. Sammin, M. Greiner, S. Grazioli, F. De Simone, H. Yadin, B. Haas, N. Bulut, V. Malirat, E. Neitzert, N. Goris, S. Parida, K. Sorensen, and K. De Clercq.** 2006. Comparative evaluation of six ELISAs for the detection of antibodies to the non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* **24**:6966-79.
 31. **Butcher, S.** 1994. Cell mediated immunity recognition of foreign peptides plus self. In N. B. H. (ed.), *Synthetic vaccines*.

32. **Butler, J. E.** 1998. Immunoglobulin diversity, B-cell and antibody repertoire development in large farm animals. *Rev Sci Tech* **17**:43-70.
33. **Carrillo, C., J. Dopazo, A. Moya, M. Gonzalez, M. A. Martinez, J. C. Saiz, and F. Sobrino.** 1990. Comparison of vaccine strains and the virus causing the 1986 foot-and-mouth disease outbreak in Spain: epizootiological analysis. *Virus Res* **15**:45-55.
34. **Carroll, A. R., D. J. Rowlands, and B. E. Clarke.** 1984. The complete nucleotide sequence of the RNA coding for the primary translation product of foot and mouth disease virus. *Nucleic Acids Res* **12**:2461-72.
35. **Clarke, B. E., S. E. Newton, A. R. Carroll, M. J. Francis, G. Appleyard, A. D. Syred, P. E. Highfield, D. J. Rowlands, and F. Brown.** 1987. Improved immunogenicity of a peptide epitope after fusion to hepatitis B core protein. *Nature* **330**:381-4.
36. **Collen, T., J. Baron, A. Childerstone, A. Corteyn, T. R. Doel, M. Flint, M. Garcia-Valcarcel, R. M. Parkhouse, and M. D. Ryan.** 1998. Heterotypic recognition of recombinant FMDV proteins by bovine T-cells: the polymerase (P3Dpol) as an immunodominant T-cell immunogen. *Virus Res* **56**:125-33.
37. **Collen, T., R. Dimarchi, and T. R. Doel.** 1991. A T cell epitope in VP1 of foot-and-mouth disease virus is immunodominant for vaccinated cattle. *J Immunol* **146**:749-55.
38. **Collen, T., and T. R. Doel.** 1990. Heterotypic recognition of foot-and-mouth disease virus by cattle lymphocytes. *J Gen Virol* **71** (Pt 2):309-15.
39. **Collen, T., L. Pullen, and T. R. Doel.** 1989. T cell-dependent induction of antibody against foot-and-mouth disease virus in a mouse model. *J Gen Virol* **70** (Pt 2):395-403.
40. **Cowan, K. M.** 1973. Antibody response to viral antigens. *Adv Immunol* **17**:195-253.
41. **Childerstone, A. J., L. Cedillo-Baron, M. Foster-Cuevas, and R. M. Parkhouse.** 1999. Demonstration of bovine CD8+ T-cell responses to foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol* **80** (Pt 3):663-9.
42. **Del Giudice, G.** 2003. Vaccination strategies. An overview. *Vaccine* **21 Suppl 2**:S83-8.
43. **Diaz-San Segundo, F., F. J. Salguero, A. de Avila, M. M. de Marco, M. A. Sanchez-Martin, and N. Sevilla.** 2006. Selective lymphocyte depletion during the early stage of the immune response to foot-and-mouth disease virus infection in swine. *J Virol* **80**:2369-79.
44. **DiMarchi, R., G. Brooke, C. Gale, V. Cracknell, T. Doel, and N. Mowat.** 1986. Protection of cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide. *Science* **232**:639-41.
45. **Doel, T. R.** 2003. FMD vaccines. *Virus Res* **91**:81-99.
46. **Doel, T. R.** 1996. Natural and vaccine-induced immunity to foot and mouth disease: the prospects for improved vaccines. *Rev Sci Tech* **15**:883-911.
47. **Doel, T. R.** 2005. Natural and vaccine induced immunity to FMD. *Curr Top Microbiol Immunol* **288**:103-31.
48. **Doel, T. R., C. Gale, C. M. Do Amaral, G. Mulcahy, and R. Dimarchi.** 1990. Heterotypic protection induced by synthetic peptides corresponding to three serotypes of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **64**:2260-4.
49. **Domingo, E., M. Davila, and J. Ortin.** 1980. Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth-disease virus. *Gene* **11**:333-46.

50. **Domingo, E., C. Escarmis, E. Baranowski, C. M. Ruiz-Jarabo, E. Carrillo, J. I. Nunez, and F. Sobrino.** 2003. Evolution of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res* **91**:47-63.
51. **Domingo, E., and J. J. Holland.** 1994. Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses, p. 161-184. *In* N. Y. R. P. Mose S.S. (de) (ed.), *The evolutionary biology of viruses*, New York.
52. **Domingo, E., and J. J. Holland.** 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol* **51**:151-78.
53. **Domingo, E., E. Martinez-Salas, F. Sobrino, J. C. de la Torre, A. Portela, J. Ortin, C. Lopez-Galindez, P. Perez-Brena, N. Villanueva, R. Najera, and et al.** 1985. The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance--a review. *Gene* **40**:1-8.
54. **Domingo, E., G. Mateu, M. Martínez, J. Dopazo, A. Moya, and F. Sobrino.** 1990. Genetic variability and antigenic diversity of foot and mouth disease virus. *Applied Virology* **2**:233-266.
55. **Domingo, E., and F. Sobrino.** 2004. Foot and mouth disease virus. *In* H. Bioscience (ed.), *Foot and mouth disease current perspectives*, Norfolk
56. **Dulbecco, R., and G. Freeman.** 1959. Plaque production by the polyoma virus. *Virology* **8**:396-7.
57. **Eble, P. L., A. Bouma, K. Weerdmeester, J. A. Stegeman, and A. Dekker.** 2007. Serological and mucosal immune responses after vaccination and infection with FMDV in pigs. *Vaccine* **25**:1043-54.
58. **Ehrenfeld, E.** 1996. Initiation of translation by picornavirus RNAs. *Translation control*:549-573.
59. **Eigen, M., and P. Schuster.** 1977. The hypercycle. A principle of natural self-organization. Part A: Emergence of the hypercycle. *Naturwissenschaften* **64**:541-65.
60. **Emilie, D., M. Peuchmaur, M. C. Maillot, M. C. Crevon, N. Brousse, J. F. Delfraissy, J. Dormont, and P. Galanaud.** 1990. Production of interleukins in human immunodeficiency virus-1-replicating lymph nodes. *J Clin Invest* **86**:148-59.
61. **Enserink, M.** 2007. Biosecurity. Reports blame animal health lab in foot-and-mouth whodunit. *Science* **317**:1486.
62. **Euzeby, J.** 1993. [Piroplasmosis transmission in mammals. Epidemiological and prophylactic consequences]. *Bull Soc Pathol Exot* **86**:176-84.
63. **Evavold, B. D., J. Sloan-Lancaster, and P. M. Allen.** 1993. Tickling the TCR: selective T-cell functions stimulated by altered peptide ligands. *Immunol Today* **14**:602-9.
64. **Fehr, T., D. Skrastina, P. Pumpens, and R. M. Zinkernagel.** 1998. T cell-independent type I antibody response against B cell epitopes expressed repetitively on recombinant virus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:9477-81.
65. **Feigelstock, D. A., M. G. Mateu, M. L. Valero, D. Andreu, E. Domingo, and E. L. Palma.** 1996. Emerging foot-and-mouth disease virus variants with antigenically critical amino acid substitutions predicted by model studies using reference viruses. *Vaccine* **14**:97-102.
66. **Forman, A. J., E. P. Gibbs, D. J. Baber, K. A. Herniman, and I. T. Barnett.** 1974. Studies with foot-and-mouth disease virus in British deer (red, fallow and roe). II. Recovery of virus and serological response. *J Comp Pathol* **84**:221-9.

67. **Fox, G., N. R. Parry, P. V. Barnett, B. McGinn, D. J. Rowlands, and F. Brown.** 1989. The cell attachment site on foot-and-mouth disease virus includes the amino acid sequence RGD (arginine-glycine-aspartic acid). *J Gen Virol* **70** (Pt 3):625-37.
68. **Francis, M. J., and L. Black.** 1983. Antibody response in pig nasal fluid and serum following foot-and-mouth disease infection or vaccination. *J Hyg (Lond)* **91**:329-34.
69. **Francis, M. J., G. Z. Hastings, F. Brown, J. McDermed, Y. A. Lu, and J. P. Tam.** 1991. Immunological evaluation of the multiple antigen peptide (MAP) system using the major immunogenic site of foot-and-mouth disease virus. *Immunology* **73**:249-54.
70. **Garcia-Briones, M. M., E. Blanco, C. Chiva, D. Andreu, V. Ley, and F. Sobrino.** 2004. Immunogenicity and T cell recognition in swine of foot-and-mouth disease virus polymerase 3D. *Virology* **322**:264-75.
71. **Gibson, C. F., A. I. Donaldson, and N. P. Ferris.** 1984. Response of sheep vaccinated with large doses of vaccine to challenge by airborne foot and mouth disease virus. *Vaccine* **2**:157-61.
72. **Giralt, M., and E. Diaz de Rada.** 1981. [Bone-marrow biopsy in the diagnosis of acute leukaemia (author's transl)]. *Sangre (Barc)* **26**:982-91.
73. **Glass, E. J., R. A. Oliver, T. Collen, T. R. Doel, R. Dimarchi, and R. L. Spooner.** 1991. MHC class II restricted recognition of FMDV peptides by bovine T cells. *Immunology* **74**:594-9.
74. **Golding, S. M., R. S. Hedger, and P. Talbot.** 1976. Radial immuno-diffusion and serum-neutralisation techniques for the assay of antibodies to swine vesicular disease. *Res Vet Sci* **20**:142-7.
75. **Grubman, M. J.** 2005. Development of novel strategies to control foot-and-mouth disease: marker vaccines and antivirals. *Biologicals* **33**:227-34.
76. **Guthrie, T., C. G. Hobbs, V. Davenport, R. E. Horton, R. S. Heyderman, and N. A. Williams.** 2004. Parenteral influenza vaccination influences mucosal and systemic T cell-mediated immunity in healthy adults. *J Infect Dis* **190**:1927-35.
77. **Haas, W., P. Pereira, and S. Tonegawa.** 1993. Gamma/delta cells. *Annu Rev Immunol* **11**:637-85.
78. **Harrison, S. C.** 1989. Picornaviruses. Finding the receptors. *Nature* **338**:205-6.
79. **Jennings, R., T. Green, and G. R. Kinghorn.** 1998. Herpesvirus vaccines: an update. *BioDrugs* **10**:257-64.
80. **Kitching, P., J. Hammond, M. Jeggo, B. Charleston, D. Paton, L. Rodriguez, and R. Heckert.** 2007. Global FMD control--is it an option? *Vaccine* **25**:5660-4.
81. **Kleid, D. G., D. Yansura, B. Small, D. Dowbenko, D. M. Moore, M. J. Grubman, P. D. McKercher, D. O. Morgan, B. H. Robertson, and H. L. Bachrach.** 1981. Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease: responses in cattle and swine. *Science* **214**:1125-9.
82. **Langeveld, J. P., J. I. Casal, E. Cortes, G. van de Wetering, R. S. Boshuizen, W. M. Schaaper, K. Dalsgaard, and R. H. Melen.** 1994. Effective induction of neutralizing antibodies with the amino terminus of VP2 of canine parvovirus as a synthetic peptide. *Vaccine* **12**:1473-80.
83. **Lavelle, E. C.** 2005. Generation of improved mucosal vaccines by induction of innate immunity. *Cell Mol Life Sci* **62**:2750-70.

84. **Lea, S., J. Hernandez, W. Blakemore, E. Brocchi, S. Curry, E. Domingo, E. Fry, R. Abu-Ghazaleh, A. King, J. Newman, and et al.** 1994. The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure* **2**:123-39.
85. **Lechner, F., A. Jegerlehner, A. C. Tissot, P. Maurer, P. Sebbel, W. A. Renner, G. T. Jennings, and M. F. Bachmann.** 2002. Virus-like particles as a modular system for novel vaccines. *Intervirology* **45**:212-7.
86. **Lee, C. C., J. A. MacKay, J. M. Frechet, and F. C. Szoka.** 2005. Designing dendrimers for biological applications. *Nat Biotechnol* **23**:1517-26.
87. **Lehman, J. R., R. M. Weigel, A. M. Siegel, L. G. Herr, A. C. Taft, and W. F. Hall.** 1993. Progress after one year of a pseudorabies eradication program for large swine herds. *J Am Vet Med Assoc* **203**:118-21.
88. **Lenz, P., P. M. Day, Y. Y. Pang, S. A. Frye, P. N. Jensen, D. R. Lowy, and J. T. Schiller.** 2001. Papillomavirus-like particles induce acute activation of dendritic cells. *J Immunol* **166**:5346-55.
89. **Liu, Y., and P. S. Linsley.** 1992. Costimulation of T-cell growth. *Curr Opin Immunol* **4**:265-70.
90. **Loeffler, F., and P. Frosch.** 1897. Summarischer bericht uber die ergebnisse der untersuchungen der kommoission zur erforschung der maul und klamenseuche. *bakterial parasintenjunde infektionskranich* **22**:257-259.
91. **Logan, D., R. Abu-Ghazaleh, W. Blakemore, S. Curry, T. Jackson, A. King, S. Lea, R. Lewis, J. Newman, N. Parry, and et al.** 1993. Structure of a major immunogenic site on foot-and-mouth disease virus. *Nature* **362**:566-8.
92. **Lopez de Turiso, J. A., E. Cortes, C. Martinez, R. Ruiz de Ybanez, I. Simarro, C. Vela, and I. Casal.** 1992. Recombinant vaccine for canine parvovirus in dogs. *J Virol* **66**:2748-53.
93. **Lopez Fuertes, L., N. Domenech, B. Alvarez, A. Ezquerria, J. Dominguez, J. M. Castro, and F. Alonso.** 1999. Analysis of cellular immune response in pigs recovered from porcine respiratory and reproductive syndrome infection. *Virus Res* **64**:33-42.
94. **Lunney, J.** 1986. The swine mayor histocompatibility complexities structure and function swine in biomedical research, p. 1821-1836. *In* P. press (ed.), *Swine in biomedical research*, New York.
95. **Macnab, S., R. White, J. Hiscox, and A. Whitehouse.** 2008. Production of an infectious Herpesvirus saimiri-based episomally maintained amplicon system. *J Biotechnol* **134**:287-96.
96. **Mahon, B. P., A. Moore, P. A. Johnson, and K. H. Mills.** 1998. Approaches to new vaccines. *Crit Rev Biotechnol* **18**:257-82.
97. **Martinez, M. A., N. Verdaguer, M. G. Mateu, and E. Domingo.** 1997. Evolution subverting essentiality: dispensability of the cell attachment Arg-Gly-Asp motif in multiply passaged foot-and-mouth disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:6798-802.
98. **Mason, P. W., M. E. Piccone, T. S. McKenna, J. Chinsangaram, and M. J. Grubman.** 1997. Evaluation of a live-attenuated foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate. *Virology* **227**:96-102.
99. **Mateu, M. G.** 1995. Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view. *Virus Res* **38**:1-24.
100. **McAleer, W. J., E. B. Buynak, R. Z. Maigetter, D. E. Wampler, W. J. Miller, and M. R. Hilleman.** 1984. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* **307**:178-80.

101. **McCullough, K., and F. Sobrino.** 2004. Immunology of foot and mouth disease, Foot and mouth disease virus peptide vaccines p. 173-223. In H. Bioscience (ed.), Foot and mouth disease current perspectives Norfolk.
102. **McCullough, K. C., F. De Simone, E. Brocchi, L. Capucci, J. R. Crowther, and U. Kihm.** 1992. Protective immune response against foot-and-mouth disease. *J Virol* **66**:1835-40.
103. **Meeusen, E. N., J. Walker, A. Peters, P. P. Pastoret, and G. Jungersen.** 2007. Current status of veterinary vaccines. *Clin Microbiol Rev* **20**:489-510, table of contents.
104. **Meloen, R. H., and S. J. Barteling.** 1986. An epitope located at the C terminus of isolated VP1 of foot-and-mouth disease virus type O induces neutralizing activity but poor protection. *J Gen Virol* **67** (Pt 2):289-94.
105. **Moron, G., P. Rueda, I. Casal, and C. Leclerc.** 2002. CD8alpha- CD11b+ dendritic cells present exogenous virus-like particles to CD8+ T cells and subsequently express CD8alpha and CD205 molecules. *J Exp Med* **195**:1233-45.
106. **Mosmann, T. R., and R. L. Coffman.** 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* **7**:145-73.
107. **Mowat, G. N., and W. G. Chapman.** 1962. Growth of foot-and-mouth disease virus in a fibroblastic cell line derived from hamster kidneys. *Nature* **194**:253-5.
108. **Mulcahy, G., C. Gale, P. Robertson, S. Iyisan, R. D. DiMarchi, and T. R. Doel.** 1990. Isotype responses of infected, virus-vaccinated and peptide-vaccinated cattle to foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* **8**:249-56.
109. **Musey, L., Y. Ding, M. Elizaga, R. Ha, C. Celum, and M. J. McElrath.** 2003. HIV-1 vaccination administered intramuscularly can induce both systemic and mucosal T cell immunity in HIV-1-uninfected individuals. *J Immunol* **171**:1094-101.
110. **Thompson, D., P. Muriel, D. Russell, P. Osborne, A. Bromley, M. Rowland, S. Creigh-Tyte, and C. Brown.** 2002. Economic costs of the foot and mouth disease outbreak in the United Kingdom in 2001. *Rev Sci Tech* **21**:675-87.
111. **Thompson, J. M., A. C. Whitmore, J. L. Konopka, M. L. Collier, E. M. Richmond, N. L. Davis, H. F. Staats, and R. E. Johnston.** 2006. Mucosal and systemic adjuvant activity of alphavirus replicon particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:3722-7.
112. **Timoney, J., P. Gillespies, Scott, F, and Barlough. J.** 1988. Hagerman's microbiology and infectious diseases of domestic animals, p. 647-667. In C. U. press (ed.). Comstock. publishing associates, Ithaca.
113. **Toja, M., C. Escarmis, and E. Domingo.** 1999. Genomic nucleotide sequence of a foot-and-mouth disease virus clone and its persistent derivatives. Implications for the evolution of viral quasispecies during a persistent infection. *Virus Res* **64**:161-71.
114. **Torres, J. M., C. Sanchez, C. Sune, C. Smerdou, L. Prevec, F. Graham, and L. Enjuanes.** 1995. Induction of antibodies protecting against transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) by recombinant adenovirus expressing TGEV spike protein. *Virology* **213**:503-16.
115. **Usherwood, E. J., and A. A. Nash.** 1995. Lymphocyte recognition of picornaviruses. *J Gen Virol* **76** (Pt 3):499-508.
116. **Vaiman, M., P. Chardon, and M. F. Rothschild.** 1998. Porcine major histocompatibility complex. *Rev Sci Tech* **17**:95-107.

117. **van Aarle, P.** 2003. Suitability of an E2 subunit vaccine of classical swine fever in combination with the E(rns)-marker-test for eradication through vaccination. *Dev Biol (Basel)* **114**:193-200.
118. **van Bakkum, J.** 1969. Correlation between serum antibody level and protection against challenge with FMDV. *In* F. a. a. o. (FAO) (ed.), Committee of the european commission for the control of foot and mouth disease, Brescia.
119. **van Bakkum, J., P. Bool, and C. Vermuelen.** 1967. Experience with the vaccination of the pigs for the control of foot and mouth disease in the Netherlands. *Tijdschr Diergeneeskde* **92**:87-97.
120. **van Bakkum, J., H. S. Frenkel, H. Frederiks, and H. S. Frenkel.** 1959. Observations on the carrier state of cattle exposed to foot and mouth disease virus. *Tijdschr Diergeneeskde* **84**:1159-1164.
121. **van der Burg, S. H., M. S. Bijker, M. J. Welters, R. Offringa, and C. J. Melief.** 2006. Improved peptide vaccine strategies, creating synthetic artificial infections to maximize immune efficacy. *Adv Drug Deliv Rev* **58**:916-30.
122. **van Der Stede, Y., T. Verfaillie, E. Cox, F. Verdonck, and B. M. Goddeeris.** 2004. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 increases IgA serum antibody responses and IgA antibody-secreting cell numbers in the Peyer's patches of pigs after intramuscular immunization. *Clin Exp Immunol* **135**:380-90.
123. **van Ginkel, F. W., H. H. Nguyen, and J. R. McGhee.** 2000. Vaccines for mucosal immunity to combat emerging infectious diseases. *Emerg Infect Dis* **6**:123-32.
124. **van Lierop, M. J., P. R. Nilsson, J. P. Wagenaar, J. M. Van Noort, J. D. Campbell, E. J. Glass, I. Joosten, and E. J. Hensen.** 1995. The influence of MHC polymorphism on the selection of T-cell determinants of FMDV in cattle. *Immunology* **84**:79-85.
125. **van Lierop, M. J., K. van Maanen, R. H. Melen, V. P. Rutten, M. A. de Jong, and E. J. Hensen.** 1992. Proliferative lymphocyte responses to foot-and-mouth disease virus and three FMDV peptides after vaccination or immunization with these peptides in cattle. *Immunology* **75**:406-13.
126. **van Lierop, M. J., J. M. van Noort, J. P. Wagenaar, V. P. Rutten, J. Langeveld, R. H. Melen, and E. J. Hensen.** 1994. T cell-stimulatory fragments of foot-and-mouth disease virus released by mild treatment with cathepsin D. *J Gen Virol* **75 (Pt 11)**:2937-46.
127. **Van Maanen, C., and C. Terpstra.** 1989. Comparison of a liquid-phase blocking sandwich ELISA and a serum neutralization test to evaluate immunity in potency tests of foot-and-mouth disease vaccines. *J Immunol Methods* **124**:111-9.
128. **van Oirschot, J. T.** 2002. [Biotechnology for the benefit of vaccination against viral diseases: a review]. *Tijdschr Diergeneeskde* **127**:7-16.
129. **van Oirschot, J. T.** 2001. Present and future of veterinary viral vaccinology: a review. *Vet Q* **23**:100-8.
130. **Weenink, S. M., and A. M. Gautam.** 1997. Antigen presentation by MHC class II molecules. *Immunol Cell Biol* **75**:69-81.
131. **Whitton, J. L., M. K. Slifka, F. Liu, A. K. Nussbaum, and J. K. Whitmire.** 2004. The regulation and maturation of antiviral immune responses. *Adv Virus Res* **63**:181-238.
132. **Yang, H., and R. M. Parkhouse.** 1998. Differential activation requirements associated with stimulation of T cells via different epitopes of CD3. *Immunology* **93**:26-32.

133. **Yang, R., F. M. Murillo, K. Y. Lin, W. H. t. Yutzy, S. Uematsu, K. Takeda, S. Akira, R. P. Viscidi, and R. B. Roden.** 2004. Human papillomavirus type-16 virus-like particles activate complementary defense responses in key dendritic cell subpopulations. *J Immunol* **173**:2624-31.
134. **Zhang, Z. D., G. Hutching, P. Kitching, and S. Alexandersen.** 2002. The effects of gamma interferon on replication of foot-and-mouth disease virus in persistently infected bovine cells. *Arch Virol* **147**:2157-67.
135. **Zuckermann, F. A., and H. R. Gaskins.** 1996. Distribution of porcine CD4/CD8 double-positive T lymphocytes in mucosa-associated lymphoid tissues. *Immunology* **87**:493-9.
136. **Zuckermann, F. A., and R. J. Husmann.** 1996. Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells. *Immunology* **87**:500-12.
137. **Zuckermann, F. A., S. Martin, R. J. Husmann, and J. Brandt.** 1999. Use of interleukin 12 to enhance the cellular immune response of swine to an inactivated herpesvirus vaccine. *Adv Vet Med* **41**:447-61.

10. ANEXO 1

Enhanced Mucosal Immunoglobulin A Response and Solid Protection against Foot-and-Mouth Disease Virus Challenge Induced by a Novel Dendrimeric Peptide^{▽†}

Carolina Cubillos,¹ Beatriz G. de la Torre,² Annamaria Jakab,² Giorgia Clementi,² Eva Borrás,² Juan Bárcena,¹ David Andreu,² Francisco Sobrino,^{1,3*} and Esther Blanco¹

Centro de Investigación en Sanidad Animal, INIA, Valdeolmos, 28130 Madrid, Spain¹; Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, 08003 Barcelona, Spain²; and Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Canto blanco, 28049 Madrid, Spain³

Received 25 February 2008/Accepted 21 April 2008

The successful use of a dendrimeric peptide to protect pigs against challenge with foot-and-mouth disease virus (FMDV), which causes the most devastating animal disease worldwide, is described. Animals were immunized intramuscularly with a peptide containing one copy of a FMDV T-cell epitope and branching out into four copies of a B-cell epitope. The four immunized pigs did not develop significant clinical signs upon FMDV challenge, neither systemic nor mucosal FMDV replication, nor was its transmission to contact control pigs observed. The dendrimeric construction specifically induced high titers of FMDV-neutralizing antibodies and activated FMDV-specific T cells. Interestingly, a potent anti-FMDV immunoglobulin A response (local and systemic) was observed, despite the parenteral administration of the peptide. On the other hand, peptide-immunized animals showed no antibodies specific of FMDV infection, which qualifies the peptide as a potential marker vaccine. Overall, the dendrimeric peptide used elicited an immune response comparable to that found for control FMDV-infected pigs that correlated with a solid protection against FMDV challenge. Dendrimeric designs of this type may hold substantial promise for peptide subunit vaccine development.

Multimerization is a nature-mimicking strategy of antigen presentation that has been proven quite successful in the development of human-made vaccines, particularly by means of dendrimeric (e.g., branching) designs (55). Numerous reports on the immunogenicity of dendrimers have been published but only a few in vivo therapeutic studies have been reported (32). Here, we describe the successful use of a dendrimeric peptide to protect pigs against challenge with foot-and-mouth disease virus (FMDV), which causes the most feared animal disease worldwide (48, 51). FMDV is a picornavirus that produces a highly transmissible and devastating disease of farm animals, mostly cattle and swine (30, 41). The FMDV particle contains a positive-strand RNA molecule of about 8,500 nucleotides, enclosed within an icosahedral capsid comprising 60 copies each of four virus proteins, VP1 to VP4. The genome encodes a unique polyprotein from which the different viral polypeptides are cleaved by viral proteases, including 11 different mature nonstructural (NS) proteins (6). Each of these NS proteins, as well as some of the precursor polypeptides, is involved in functions relevant to the virus life cycle in infected cells (5). FMDV shows a high genetic and antigenic variability, reflected in the seven serotypes and the numerous variants described to date (21). FMD control in regions of endemicity is implemented mainly by using chemically inactivated whole-virus vaccines (4). Viral infection and immunization with conventional

vaccines usually elicit high levels of circulating immunoglobulin G (IgG)-neutralizing antibodies that correlate with protection against the homologous and antigenically related viruses (46). Evidence of the role of specific IgA in protection includes early work suggesting that pigs immunized intramuscularly with conventional, inactivated vaccines elicited levels of neutralizing activity in nasal fluid lower than those observed for serum, in contrast to what was seen for infected pigs, where antibody responses in sera and upper mucosae were comparable (23). Recently, induction of low IgA responses has been correlated with complete protection against challenge in pigs immunized with a highly concentrated inactivated vaccine (22).

Despite its wide use, immunization with chemically inactivated vaccines has disadvantages, such as the need for a cold chain to preserve virus stability, the risk of virus release during vaccine production, and the problems for serological distinction between infected and vaccinated animals (20). These have led FMDV-free countries to adopt a nonvaccination policy that relies on slaughtering infected and contact herds and strict limitations on animal movements and trading in case of viral outbreaks. Such FMDV reemergences have caused massive and controversial culling of affected and suspected farm animals (51). Thus, much effort has been invested in the search of alternative, safe immunogens. The main antigenic sites recognized by B lymphocytes have been identified at defined structural motifs exposed on the capsid surface, whose amino acid sequences accumulate variations among different serotypes (1, 33). A continuous, immunodominant B-cell site located in the GH loop, around positions 140 to 160 of capsid protein VP1 (7), has been widely used as an immunogenic peptide (19). However, the protection conferred to natural hosts by linear peptides spanning the GH loop of VP1 is limited and can

* Corresponding author. Mailing address: CBMSO, Universidad Autónoma de Madrid, Canto blanco, 28049 Madrid, Spain. Phone and fax: (34) 91-1964493. E-mail: fsobrino@cbm.uam.es.

† Supplemental material for this article may be found at <http://jvi.asm.org/>.

▽ Published ahead of print on 30 April 2008.

TABLE 1. Synthetic peptides used in this study

Peptide	FMDV protein (residues)	Sequence
B	VP1 (136–154)	YTASARGDLAHLTTTHARH-amide
T	3A (21–35)	AAIEFFEGMVHDSIK-amide
B ₄ T ^a	VP1 (136–154), 3A (21–35)	<div><p>Ac-YTASARGDLAHLTTTHARH-C</p><p>Ac-YTASARGDLAHLTTTHARH-C</p><p>Ac-YTASARGDLAHLTTTHARH-C</p><p>Ac-YTASARGDLAHLTTTHARH-C</p><p>↓</p><p>CH₂CO</p><p>CH₂CO-K</p><p>CH₂CO-K</p><p>CH₂CO-K</p><p>K-KK-AAIEFFEGMVHDSIK-amide</p></div>

^a The arrow in the sequence for B₄T indicates a putative cathepsin D cleavage site.

correlate with the selection of escape mutants in unprotected animals (53). The lack of T-cell epitopes widely recognized by individuals of domestic populations of natural host and capable of providing adequate cooperation to immune B lymphocytes has been proposed as one of the limiting factors for the development of efficient FMD peptide vaccines (15, 52). Although induction of neutralizing antibodies is considered to be the most important immune correlate to FMDV protection, specific T cells are also induced in convalescent and conventionally vaccinated animals (17, 44). In addition, the partial protection conferred in host species by subunit vaccines delivered using eukaryotic vectors, which did not elicit neutralizing antibodies, has been shown to correlate with the induction of specific T-cell responses (49). Several T-cell epitopes frequently recognized by natural host lymphocytes have been identified in FMDV proteins (8, 9, 16, 24, 26, 58). One of these T-cell epitopes, located in residues 21 to 35 of FMDV NS protein 3A, efficiently stimulated lymphocytes from infected pigs and induced significant levels of serotype-specific anti-FMDV activity in vitro when synthesized juxtaposed to the VP1 GH loop (8). This T-cell epitope was frequently recognized by lymphocytes from outbred pigs infected with different FMDV serotypes (25) and its amino acid sequence is conserved among FMDV types A, O, and C, showing limited variation among isolates from the seven FMDV serotypes (14).

In this work, we have assessed the immunogenicity in the pig, a major natural FMDV host, of a dendrimeric peptide that integrates the aforementioned B and T epitopes. The rationale for this design was to enhance the effectiveness of presentation to the porcine immune system of viral antigenic sites capable of stimulating B- and T-cell-specific lymphocytes (8, 53). The dendrimeric construction specifically induced high titers of FMDV-neutralizing antibodies, activation of T cells, and potent anti-FMDV IgA responses (systemic and mucosal), even when administered by the parenteral route. Pigs vaccinated with the dendrimeric peptide did not develop significant clinical signs upon FMDV challenge and inhibited local replication and airborne excretion of virus. Thus, dendrimeric designs of this type may hold substantial promise for peptide subunit vaccine development.

MATERIALS AND METHODS

Synthetic dendrimeric peptide. The dendrimeric peptide B₄T (Table 1) was built from two separately synthesized precursors in which the FMDV sequences were those of the serotype C isolate C-S8c1 (57).

A peptide {[C(CH₂CO)K]₂KKKAAIEFFEGMVHDSIK-amide} reproducing the 3A(21-35) T-cell epitope, which was (i) elongated at the N terminus by two Lys residues and followed by a four-branched Lys tree and (ii) derivatized as four chloroacetyl groups, was assembled on 0.1 mmol of Rink amide-polystyrene resin (Bachem AG, Bubendorf, Switzerland) by use of 9-fluorenylmethoxy carbonyl (Fmoc) chemistry in an ABI433 synthesizer (Applied Biosystems, Foster City, CA) running FastMoc synthesis files. One-millimole couplings (10-times molar excess) of each Fmoc amino acid were mediated by 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate and *N*-hydroxybenzotriazole in the presence of *N,N*-diisopropylethylamine (2 mmol) in *N,N*-dimethylformamide. The three lysine residues making up the four branches were incorporated in the manual mode as Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, followed by coupling of the pentachlorophenyl ester of 2-chloroacetic acid (2.4 mmol, 6-times molar excess) in *N,N*-dimethylformamide. The peptide was deprotected, cleaved off the resin with trifluoroacetic acid-triisopropylsilane-water (96:2:2 [vol/vol], 2 h, 25°C), and precipitated by treatment with chilled diethyl ether and 10 min of centrifugation at 4,000 rpm, 5°C. The residue was taken up in 10% acetic acid, filtered, lyophilized, and then purified by preparative high-performance liquid chromatography (HPLC) to give an HPLC-homogeneous product which by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry gave a major peak at *m/z* 2637.4 (MH⁺, monoisotopic), which was compatible with the target structure.

The acetyl-YTASARGDLAHLTTTHARHC-amide sequence, corresponding to the B-cell epitope (residues 136 to 154 of VP1 of FMDV isolate C-S8c1), plus a C-terminal Cys residue to be used for ligation, was assembled by automated Fmoc synthesis as described above. A similar workup and preparative HPLC furnished the purified product, with *m/z* 2222.3 (MH⁺, monoisotopic) by MALDI-TOF mass spectrometry, in agreement with the target structure.

For the chemical ligation of the above-described fragments, 6 mg of the tetravalent chloroacetylated T-cell epitope peptide was dissolved in 12 ml of 20 mM Tris, pH 7. The B-cell epitope peptide (60 mg) was added portionwise to this solution over 4 h, keeping the pH at 7 by the addition of dilute NaOH. The progress of the reaction was monitored by analytical HPLC and MALDI-TOF mass spectrometric analysis of aliquots from the ligation mixture until no further change in the HPLC profile could be observed, at ca. 24 h. At this point, the mixture was acidified with trifluoroacetic acid, lyophilized, and purified by preparative HPLC. Fractions rich in B₄T and trisubstituted conjugate (see the supplemental material) were lyophilized (14 mg) and used for immunization.

Virus. A virus stock derived from type C FMDV isolate C-S8c1 (50) by two amplifications in BHK-21 cells, which maintained the consensus sequences at the capsid protein region (38), was used in this study.

Immunization and infection of pigs. Six domestic Landrace × Large White pigs, 2 months old, weighing 30 to 40 kg, and free of antibodies to FMDV, were placed in the same box. Four animals (immunized pigs 1 to 4) were inoculated

twice by intramuscular injection with 1.4 mg of dendrimer peptide emulsified with complete Freund's adjuvant at day 0 and with incomplete Freund's adjuvant at day 21. Two contact, noninoculated pigs (pigs 5 and 6) were kept in the same box. Eighteen days after boosting, the four immunized animals were challenged intradermally in one heel bulb with 10^4 PFU of FMDV C-S8c1. Two additional pigs, pigs 7 and 8 (controls of infection), were challenged using the same conditions in a separate box. The infected animals (four immunized and two control pigs) were monitored daily for 10 days for the emergence of FMD clinical signs (e.g., vesicles on the feet and snout, hyperthermia) and then were euthanized. The two contact pigs, pigs 5 and 6, were also inspected during this 10-day postchallenge period to monitor virus transmission. Subsequently, contact pigs were challenged intradermally with the same dose of FMDV and monitored for an additional 10 days for clinical signs.

Seroneutralization assay. Virus-neutralizing activity was determined in sera by a standard microneutralization test performed in 96-well plates by incubating serial twofold dilutions of each serum sample with 100 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀) of FMDV CS8c1 for 1 h at 37°C. The remaining viral activity was determined in 96-well plates containing fresh monolayers of BHK-21 cells. End-point titers were calculated as the reciprocal of the final serum dilution that neutralized 100 TCID₅₀ of FMDV C-S8c1 in 50% of the wells (27). The neutralizing activity of the nasal fluid samples was determined by the same method except that the virus dose was reduced to 10 TCID₅₀ (23).

Detection of specific anti-FMDV antibodies by ELISA. An antiviral sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (3) was used to measure FMDV-specific antibodies. Briefly, Maxisorb 96-well ELISA plates (Nunc) were coated with rabbit anti-FMDV serotype C and then incubated with clarified tissue culture virus. Sera were analyzed on the plates diluted at 1/100 and 1/200 in duplicate, and specific antibodies were detected with horseradish peroxidase conjugated to protein A (Sigma). Antibody titers were expressed as the A_{492} (in optical density [OD] units) at a serum dilution of 1/200 (background signals at day 0 were always under 0.2).

Detection of isotype-specific antibodies to FMDV. FMDV-specific IgG1, IgG2 (in sera), and IgA (in sera and nasal swabs) were measured using a modification of the indirect double antibody sandwich ELISA (47). Monoclonal antibodies specific for these isotypes were supplied by Serotec. Duplicate threefold dilution series of each serum sample were made, starting at 1/50 (1/10 for nasal swabs). One hundred-microliter volumes were used throughout. In the case of nasal swabs, two consecutive incubations with sample were performed before adding the commercial monoclonal antibody to porcine IgA, in order to increase the sensitivity of the assay. In these assays, it was found that the point on the titration curve corresponding to an A_{492} of 1.0 invariably fell on the linear part of the curve. Antibody titers were therefore expressed as the reciprocal of the last dilution calculated by interpolation to give an absorbance of 1 above background. IgA titers in nasal swabs were expressed as the absorbance at a dilution of 1:10.

Antibodies against 3ABC protein. Serum samples were examined for the presence of antibodies against NS FMDV protein 3ABC, indicative of virus replication, by use of a direct ELISA (10).

Lymphoproliferation assay. Proliferation assays of swine lymphocytes were performed as described previously (9). Blood was collected in 5 μ M EDTA and used immediately for the preparation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (44). Assays were performed in 96-well round-bottomed microtiter plates (Nunc). Briefly, 2.5×10^5 PBMC per well were cultured in triplicate, in a final volume of 200 μ l, in complete RPMI, 10% (vol/vol) fetal calf serum, 50 μ M 2-mercaptoethanol, in the presence of various concentrations of (i) FMDV, ranging from 3×10^5 to 2×10^3 PFU, and (ii) synthetic peptides, ranging from 50 μ g/ml to 10 μ g/ml. Cultures with medium alone or with mock-infected cells were included as controls. Cells were incubated at 37°C in 5% CO₂ for 4 days. Following incubation, each well was pulsed with 0.5 μ Ci of [*methyl*-³H]thymidine for 18 h. The cells were collected using a cell harvester and the incorporation of radioactivity into the DNA was measured by liquid scintillation counting with a Microbeta counter (Pharmacia). Results were expressed as stimulation indexes (SI), which were calculated as the mean counts per minute (cpm) of stimulated cultures/mean cpm of cultures grown in the presence of medium alone (peptide) or mock-infected cells (virus).

Cytokine detection. PBMC supernatants were cultured with 20 μ g/ml of B₄T for 48 h and 72 h and analyzed for cytokine expression using interleukin-10 (IL-10) CytoSets (Biosource) and gamma interferon (IFN- γ) ELISA (Pierce, Endogen) kits. Preliminary work had shown this peptide concentration and these incubation times to be optimal. In each assay, the corresponding recombinant porcine cytokine was diluted over the detection range recommended by the manufacturer to generate a standard curve from which sample concentrations (in pg/ml) were calculated.

RT-PCR. Viremia and virus shedding were analyzed by detection of FMDV viral RNA in blood and nasal and pharyngeal swabs by use of reverse transcription-PCR (RT-PCR) amplification of a three-dimensional RNA region as described previously (45).

RESULTS

B₄T design and synthesis. The general structure of the FMDV dendrimeric peptide construction (B₄T) used as the immunogen is depicted on Table 1. The construct is designed to display in a single molecule four copies of the VP1 (136 to 154) B-cell epitope (also known as antigenic site A) joined to a T-cell epitope from NS protein 3A (residues 21 to 35) through a lysine tree (54) plus two additional Lys residues defining a putative cleavage site for cathepsin D, a protease suggested to be involved during *in vivo* major histocompatibility complex (MHC) class II antigen processing (59). A convergent synthetic approach was chosen for B₄T, based on the chemoselective thioether ligation (54) of (i) a tetravalent peptide reproducing the T-cell epitope, N-terminally elongated with two (cathepsin D site) plus three more Lys residues making up the dendrimeric core (these last three with their α and ϵ amino groups functionalized as 2-chloroacetyl derivatives) (Table 1); and (ii) a 19-residue peptide corresponding to the B-cell epitope, acetylated at the N terminus and C-terminally elongated with a Cys residue. The chemical ligation at pH 7 was monitored by HPLC and MALDI-TOF mass spectrometry until an end point was reached; preparative HPLC then allowed purification of fractions enriched in B₄T and the trivalent dendrimer, which were used for immunization experiments.

Immunization with the peptide B₄T affords protection against FMDV and prevents contact virus transmission from challenged animals. Four domestic pigs (pigs 1 to 4) were immunized twice with peptide B₄T. At day 18 postboost, pigs were challenged with FMDV and the occurrence of clinical signs was scored for 10 days (see Materials and Methods). Upon challenge, peptide-immunized animals showed no significant clinical FMD signs, including viremia (estimated by RT-PCR viral RNA amplification) (Table 2). Also, no viral RNA was amplified by RT-PCR from either blood samples or nasal and pharyngeal fluids (Table 2). Interestingly, no contact transmission was observed from challenged animals, as two naive pigs (pigs 5 and 6) housed with peptide-vaccinated ones for 10 days after FMDV challenge did not develop clinical signs of disease. To confirm this lack of FMDV transmission, pigs 5 and 6 were inoculated with FMDV 10 days later. As expected for animals with no previous contact with FMDV, both pigs 5 and 6 developed viremia and typical FMD signs, including lameness, hyperthermia, and vesicles in all four feet and snout by days 3 (pig 5) and 4 (pig 6) postinoculation. Likewise, nasal and pharyngeal fluids from pigs 5 and 6 were positive at different days postinoculation (Table 2). The two control pigs, pigs 7 and 8, which were infected but not immunized (housed separately), developed FMD clinical lesions by day 3 and, as expected, their nasal and pharyngeal fluids were positive at different days postinoculation (data not shown). These results indicate that immunization of pigs with peptide B₄T confers solid protection against viral challenge and limits

TABLE 2. Evidence for protection in animals immunized with B₄T peptide

Animal	Inoculum	Protection ^a	Fever ^b	Viral RNA ^c	NSP ELISA ^d	Detection of FMDV RNA in respiratory tract samples (N, P) ^e at indicated day postinoculation			
						0	3	7	10
1	B ₄ T	+	—	—	—	—, —	—, —	—, —	—, —
2	B ₄ T	+	—	—	—	—, —	—, —	—, —	—, —
3	B ₄ T	+	—	—	—	—, —	—, —	—, —	—, —
4	B ₄ T	+	—	—	—	—, —	—, —	—, —	—, —
5 ^f	PBS ^g	—	+	+	+	—, —	+, +	—, +	—, +
6 ^f	PBS	—	+	+	+	—, —	+, +	—, +	—, +

^a Absence of significant clinical signs of FMD (including vesicles at the site of inoculation). A single, minute (<5-mm-diameter), transient (<24-h) vesicle in animal 3 was not considered significant.

^b Rectal temperature of >39.5°C.

^c Amplification of FMDV RNA from blood by RT-PCR (viremia).

^d NSP, NS protein.

^e N and P, nasal and pharyngeal swabs, respectively.

^f Results for these pigs correspond to analyses performed after inoculation of the virus (day 59, 10 days postinfection).

^g PBS, phosphate-buffered saline.

FMDV replication as to prevent transmission to contact animals.

Peptide B₄T elicits systemic neutralizing antibodies and high titers of specific IgAs. Significant titers of neutralizing antibodies were found in sera from pigs 1 to 4 at 14 days after inoculation of the first dose of peptide (Table 3), which were raised in three of the animals at 21 days postimmunization. After a second peptide dose, these titers were boosted up to 2 log units at day 39 (18 days after the second dose). Neutralization titers slightly increased upon viral challenge for pigs 2 and 3 but remained unchanged for pigs 1 and 4 (Table 3). For pigs 5 and 6, no neutralizing antibodies could be detected for the period of contact with immunized, challenged animals; in contrast, high titers were found following FMDV inoculation (Table 3), similar to those detected for pigs 7 and 8, controls for infection (data not shown).

Likewise, total IgG antibodies to FMDV were detected for pigs 1 to 4 by ELISA at 14 days postimmunization with peptide B₄T, reaching maximum values at day 39 and showing no increase after FMDV challenge (Table 3). Similar IgG1 and IgG2 titers were found on day 21, both isotypes being highly boosted after the second dose of B₄T, with titers reaching at least 3 log units (Fig. 1A). Conversely, contact pigs 5 and 6 developed specific IgGs only after FMDV inoculation, with

isotype profiles similar to those observed for the peptide-immunized animals (Table 3 and Fig. 1B).

Inhalation of airborne FMDV, leading to virus replication in the respiratory tract, is considered as the most common route for natural transmission of this virus. Therefore, we also examined the effect of vaccination on systemic and local IgA responses. Remarkably, immunization with peptide B₄T induced a strong systemic IgA-specific response (Fig. 2). Sera from three out of four immunized pigs showed FMDV-specific IgA from day 21, with titers above 2 log units. The titers increased after the second dose, reaching by day 39 (challenge) values higher than those seen for contact pigs 10 days after inoculation. Specific IgA titers were also found for nasal fluids of B₄T-immunized pigs (Fig. 2A). This mucosal response was associated with significant titers of neutralizing activity in fluids from nasal samples (Table 3). On the other hand, whereas FMDV challenge caused no boost in systemic IgA levels of peptide-immunized animals, mucosal titers did experience a substantial increase (Fig. 2A). Conversely, for contact pigs 5 and 6, IgAs were detected only after inoculation, with mucosal titers reaching levels similar to those seen for immunized pigs (Fig. 2B).

Peptide B₄T induces FMDV-specific T-cell responses. Induction of FMDV-specific T cells was detected in lymphopro-

TABLE 3. Antibody responses to FMDV in sera and nasal swabs analyzed by neutralization assay and ELISA

Animal	Response on indicated day after immunization (detection method) ^a					
	0 (VNT/ELISA)	14 (VNT/ELISA)	21 ^b (VNT/ELISA)	39 (VNT/ELISA; VN-NS)	49 ^c (VNT/ELISA; VN-NS)	59 ^d (VNT/ELISA)
1	<1/0.23	1/0.48	1.3/0.94	2.2/1.58; 1.8	2.2/1.48; 1.2	— ^e
2	<1/0.25	1/0.41	1.3/1.09	1.9/1.46; 1.5	2.2/1.38; 1.8	—
3	<1/0.22	1/0.31	1.3/0.45	1.9/1.34; 1.2	2.2/1.38; 1.8	—
4	<1/0.21	1/0.34	1/0.84	2.2/1.55; 1.8	2.2/1.57; 1.8	—
5	<1/0.20				<1/0.30; <1	2.8/1.73
6	<1/0.23				<1/0.25; <1	3.4/1.61

^a VNT, virus neutralization titer (log₁₀ of the reciprocal of the last dilution able to neutralize 100 TCID₅₀s of homologous FMDV). ELISA, OD at 620 nm obtained by analyzing the sera diluted 1/200 with ELISA. VN-NS, virus neutralization titer for nasal swabs (log₁₀ of the reciprocal of the last dilution able to neutralize 10 TCID₅₀s of homologous FMDV).

^b Day 21, second dose given (pigs 1 to 4).

^c Day 49, 10 days postchallenge (pigs 1 to 4) and 10 days postcontact (pigs 5 and 6).

^d Day 59, 10 days postinoculation (pigs 5 and 6).

^e —, Sera not available.

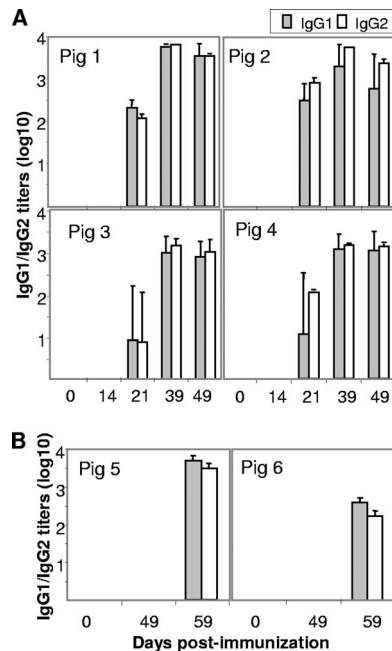


FIG. 1. Serum IgG1- and IgG2-specific responses in pigs following FMDV infection. (A) Peptide-immunized animals. (B) Contact pigs. Titers are expressed as reciprocals of the last dilution of sera (\log_{10}), calculated by interpolation to give an A_{492} of 1.0 OD unit. Each bar corresponds to geometric mean of at least two determinations \pm standard error. At day 21, pigs 1 to 4 were immunized with a second dose of peptide. Day 49 corresponds to 10 days postchallenge (pigs 1 to 4) or 10 days postcontact (pigs 5 and 6). Day 59 corresponds to 10 days postinoculation for pigs 5 and 6.

liferation assays with PBMC of peptide-immunized pigs. High specific responses (SI, >6) against either FMDV or peptide B₄T were found for lymphocytes from pigs 1 to 4 collected at day 39 (Fig. 3A). Proliferative responses were also detected after virus challenge; in this case, the SI was on average slightly lower than those determined before challenge (Fig. 3B). No stimulation was observed with PBMC either from pigs 1 to 4 or from contact pigs 5 and 6 prior to FMDV inoculation (data not shown).

Production of IFN- γ , a Th1-cytokine, was detected in supernatants of PBMC from immunized pigs collected at day 39 in response to in vitro stimulation with peptide B₄T but not in mock-stimulated cultures (Fig. 4A). IFN- γ levels correlated with the lymphoproliferative responses found. Thus, IFN- γ amounts higher than 70 pg/ml were detected for stimulated lymphocytes from pigs 1, 2, and 4, while pig 3 had a lower level (15 pg/ml). Conversely, amounts of IL-10 above the sensitivity of the assay were detected only for lymphocytes from pigs 1 and 2 (Fig. 4B). This pattern of cytokine production suggested that peptide B₄T elicited FMDV-specific T cells that, when stimulated in vitro, developed a response dominated by Th1. After FMDV challenge (day 49), a clear decrease in IFN- γ and IL-10 release was detected (Fig. 4).

Immunization with peptide B₄T allows differentiation of infected and vaccinated pigs. To assess whether peptide immunization induced an antibody response distinguishable from that of infected animals, serum samples from pigs 1 to 4 collected at days 39 and 49 (10 days postchallenge) were analyzed

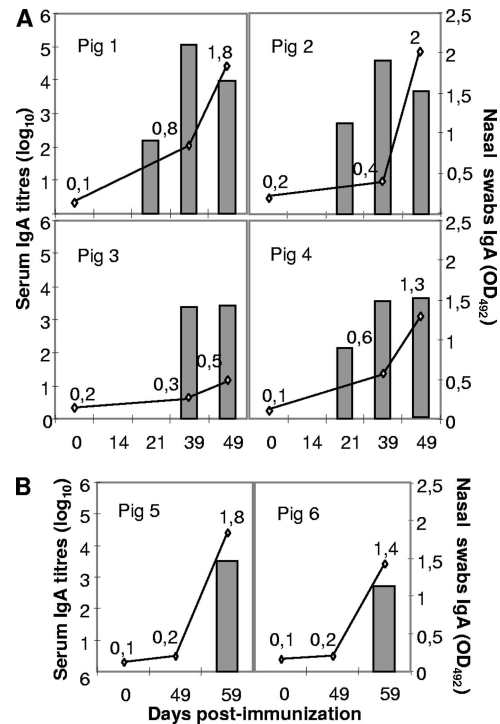


FIG. 2. IgA-specific responses to FMDV. Shown are sera (bars) and nasal fluids (open circles) collected at different days after peptide immunization (pigs 1 to 4) (A) or after contact with peptide-immunized pigs (animals 5 and 6) (B). Mean titers of IgA in sera are expressed as described in the legend to Fig. 1. Titers of IgA in nasal fluids are expressed as the OD at 492 nm (OD_{492}) value (shown above each time point) obtained with a 1/10 serum dilution.

for antibodies to NS protein 3ABC. None of the sera tested positive. On the other hand, for pigs 5 and 6 no anti-3ABC response was detected during the contact period, whereas consistent titers were found after viral inoculation (Table 2) that were similar to those detected for pigs 7 and 8, controls for infection (data not shown).

DISCUSSION

Mimicking protective responses using synthetic peptides poses an attractive and multidisciplinary challenge. Despite the potential advantages of this approach—such as innocuousness, thermal stability, and easy scale-up—the complexity of the interactions between pathogens and host immune responses have limited the development of successful peptide vaccines (31, 34, 43).

Multimerization of peptides, such as that provided by dendrimeric constructs, has long been recognized as one of the most effective tools for enhancing peptide immunogenicity (11, 54). In the present work, we report solid protection of pigs against FMDV challenge conferred by a dendrimeric peptide containing one B- and one T-cell immunodominant epitope. Intramuscular immunization with peptide B₄T prevented the emergence of clinical signs and contact transmission in the four pigs studied upon a severe FMDV challenge. The two control naive pigs that were housed with the immunized animals during the challenge period did not show clinical signs but devel-

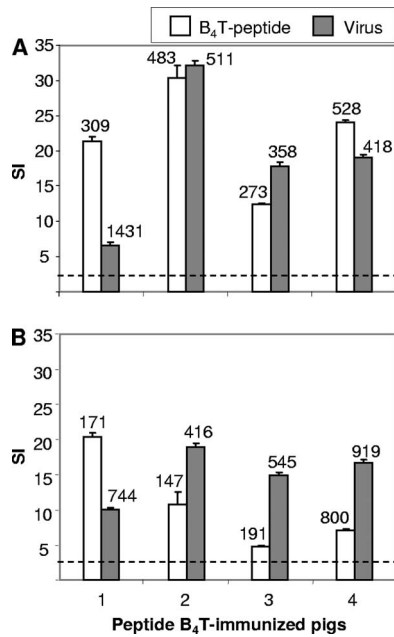


FIG. 3. Specific T-cell responses in peptide-immunized pigs. Samples were collected at days 39 (day of challenge) (A) and 49 (10 days postinfection) (B). Peak lymphoproliferative responses of pigs 1 to 4 to peptide B₄T (20 μ g/ml) and to FMDV C-S8c1 (10^5 TCID₅₀/ml) are shown. Data are shown as SI (see Materials and Methods) and standard deviations are indicated. The cpm obtained in the corresponding control cultures are shown above each bar.

oped them upon subsequent FMDV infection. The failure to detect FMDV RNA in either serum or nasal samples, as well as the absence of transient leucopenia associated with FMDV infection (18), supported by the lack of reduction of the proliferative response to the mitogen concanavalin A in the pigs immunized with peptide B₄T (data not shown), confirmed that the levels of virus replication in these animals were below those required for virus spread and disease triggering.

This solid protection conferred by peptide B₄T correlated with the detection of high levels of circulating neutralizing FMDV antibodies that were boosted after the second peptide dose, with titers around 2 log values, i.e., about 1 log unit lower than those developed by contact pigs after 10 days of infection. Differences in the IgG1/IgG2 ratio induced by FMDV vaccination or infection versus those found for peptide-immunized animals have been correlated with the lack of solid protection conferred by the latter (36, 53). The IgG1 and IgG2 titers induced by peptide B₄T were similar to those detected for infected contact pigs, suggesting no major differences in the isotype modulation induced.

Interestingly, FMDV-specific IgA titers were detected for three of the pigs as soon as 21 days after the first immunization with peptide B₄T and were boosted for all animals after the second B₄T dose, reaching 4- to 5-log values for pigs 1 and 2 and somewhat lower levels for pigs 3 and 4 (3 to 4 log units, similar to what was seen for infected control pigs). Remarkably, specific IgA antibodies were also detected for nasal samples from three of the four B₄T-vaccinated pigs before challenge. After virus challenge, the nasal IgA titers were boosted for the four immunized animals, reaching values similar to

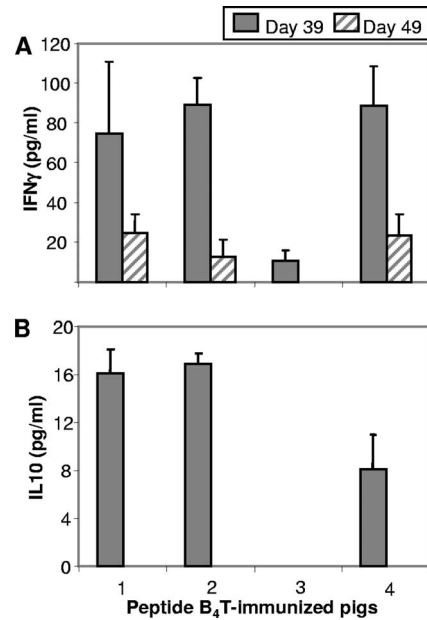


FIG. 4. In vitro stimulation of cytokines. IFN- γ (A) and IL-10 (B) released by PBMC from peptide-immunized pigs stimulated in vitro with 20 μ g/ml of peptide B₄T. Peak values (in pg/ml) were detected by ELISA at 48 h and 72 h of in vitro stimulation for IL-10 and IFN- γ , respectively (see details in Materials and Methods). The detection levels for both cytokines in control cultures (medium alone) were below the sensitivity of the assays (7 pg/ml for IFN- γ and 15 pg/ml for IL-10).

those observed for infected contact pigs. In contrast to other vaccines having to rely on mucosal delivery to access the natural inductive pathway (29, 35, 39), B₄T can induce high mucosal immune responses by parenteral administration. Several different, nonexclusive mechanisms have been proposed to explain the production of secretory antibodies after parenteral administration of the antigen, including direct diffusion of soluble or phagocytosed antigens to mucosa-associated lymphoid tissue or activation of antigen-presenting cells at draining lymph nodes, which then migrate to mucosa-associated lymphoid tissue (12). In any event, parenterally administered antigens capable of inducing strong mucosal immunity, such as our B₄T dendrimer or a few other immunogens so far described (28, 37, 56), appear to be good candidates for future mucosal vaccines. They can overcome some of the main problems associated with mucosal administration, such as local degradation or physical ejection of the vaccine, both of which hamper the control of the dose delivered.

The intradermal route for FMDV inoculation was chosen according to potency requirements for FMD vaccines (47). The correlation found between solid protection and IgA induction raises the interesting possibility of assessing the protection conferred by B₄T peptide by use of respiratory/exposure challenge conditions, which are likely to be more similar to field transmission.

The functional role in protection of the T cells induced by FMDV and of the balance of cytokines they release remains to be well established (2). Immunization with peptide B₄T elicited T cells that consistently proliferated when stimulated with the peptide as well as with FMDV. After FMDV challenge, while

the lymphoproliferative response to peptide was reduced in three out of four animals, proliferation to the virus was instead maintained. This suggests that immunization with peptide B₄T primes T cells that can recognize the viral epitopes presented in the context of a subsequent virus encounter. Upon *in vitro* peptide stimulation, the primed T cells released IFN- γ and to a lower extent IL-10. IFN- γ is a major activator of macrophages, enhancing their antimicrobial activity and their capacity for processing and presenting antigens to T lymphocytes. In pigs, the majority of IFN- γ -producing cells are $\alpha\beta$ T lymphocytes, and within these the majority are of the double-positive CD4⁺ CD8⁺ subset, which contains memory T cells (42). It has been reported that IFN- γ stimulates MHC expression in antigen-presenting cells and efficiently inhibits FMDV replication (60). Altogether, our results suggest that priming of porcine T cells with peptide B₄T induces a T-cell activation that efficiently contributes to FMDV protection.

Animal-to-animal variations have been reported for the protective responses to peptide vaccines, including those against FMDV (16, 53), and have been associated with the MHC-restricted recognition of the T-cell epitopes included in their compositions (25). Interestingly, despite the differences in the B- and T-cell responses elicited by the four animals in this study, all of them turned out to be protected after FMDV challenge, suggesting that peptide B₄T can elicit B- and T-cell responses sufficient to cope with virus replication, thus minimizing the chances of selecting escape virus (53).

The mechanisms leading to the solid protection conferred by peptide B₄T remain to be known in detail. Peptides where the present B- and T-cell epitopes were simply juxtaposed in a linear fashion elicited only partial protection in pigs and low levels of FMDV-specific systemic IgAs (C. Cubillos, I. Avalos, E. Borrás, B. G. de la Torre, J. Bárcena, D. Andreu, F. Sobrino, and E. Blanco, unpublished results). This suggests that either the dendrimeric presentation of the B-cell site or the inclusion of a T-cell site separated from the dendrimeric B sites by a cathepsin D cleavage site or both could be relevant for the antibody response observed. Also, a role in protection of FMDV-specific T-cell epitopes has been found for animals immunized with vaccinia virus recombinants expressing FMDV three-dimensional protein in the absence of B-cell capsid antigenic sites (24).

Differentiation between vaccinated and infected animals is of great interest, both to monitor virus circulation and to avoid trade restrictions on animals or animal products from countries applying vaccination by those not applying it. This is a controversial issue for the control of animal diseases, particularly FMD (40). Interestingly, our B₄T peptide induced a serological response compatible with its use as a vaccine facilitating the differentiation of infected from vaccinated animals, since it did not elicit antibodies to the NS protein 3ABC, which are diagnostic for FMDV replication (13).

The number of animals in this study is similar to those in many other introductory studies on vaccine candidates, although it is not enough for statistical demonstration. Even so, the results strongly support that immunization with peptide B₄T can elicit in pigs an immune response similar to that induced in control animals after FMDV infection. This response associates not only with the prevention of clinical disease but also with the inhibition of the local replication and the

airborne excretion of FMDV. These results point to this dendrimeric peptide approach as an interesting candidate for the improvement of peptide subunit vaccines. To address how useful the immunogenic potential of this approach can become, experiments are in progress to assess whether analogous peptide constructs including B-cell epitopes from other FMDV serotypes can confer solid protection against FMDV challenge in pigs and cattle.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Javier Domínguez and Angel Ezquerro for fruitful discussions.

Work at CBMSO and INIA was supported by Spanish grants from CICYT (BIO2002-04091-C03-02/03 and BIO2005-07592-C02-01), MEC (CSD2006-0007), and Fundación Severo Ochoa and by an EU grant (SSP503603). Work at UPF was supported by the Spanish Ministry of Education and Science (grant BIO2002-04091-C03-01 and BIO2005-07592-C02-02) and by Generalitat de Catalunya (SGR00494 and CIDEM-BAPP). C.C. was supported by a predoctoral fellowship from Ministerio de Educación y Ciencia (FPI).

REFERENCES

- Acharya, R., E. Fry, D. Stuart, G. Fox, D. Rowlands, and F. Brown. 1989. The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature* **337**:709–716.
- Barnard, A. L., A. Arriens, S. Cox, P. Barnett, B. Kristensen, A. Summerfield, and K. C. McCullough. 2005. Immune response characteristics following emergency vaccination of pigs against foot-and-mouth disease. *Vaccine* **23**:1037–1047.
- Barnett, P. V., L. Pullen, L. Williams, and T. R. Doel. 1996. International bank for foot-and-mouth disease vaccine: assessment of Montanide ISA 25 and ISA 206, two commercially available oil adjuvants. *Vaccine* **14**:1187–1198.
- Barteling, S. J. 2004. Modern inactivated foot-and-mouth disease (FMD) vaccines: historical background and key elements in production and use. Horizon Bioscience, Norfolk, United Kingdom.
- Baxt, B., and E. Rieder. 2004. Molecular aspects of foot-and-mouth disease virus virulence and host range: role of host cell receptors and viral factors, p. 145–172. *In* F. Sobrino and E. Domingo (ed.), *Foot-and-mouth disease. Current perspectives*. Horizon Bioscience, Norfolk, United Kingdom.
- Belsham, G. J. 2005. Translation and replication of FMDV RNA. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **288**:43–70.
- Bittle, J. L., R. A. Houghton, H. Alexander, T. M. Shinnick, J. G. Sutcliffe, R. A. Lerner, D. J. Rowlands, and F. Brown. 1982. Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature* **298**:30–33.
- Blanco, E., M. García-Briones, A. Sanz-Parra, P. Gomes, E. De Oliveira, M. L. Valero, D. Andreu, V. Ley, and F. Sobrino. 2001. Identification of T-cell epitopes in nonstructural proteins of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **75**:3164–3174.
- Blanco, E., K. McCullough, A. Summerfield, J. Fiorini, D. Andreu, C. Chiva, E. Borrás, P. Barnett, and F. Sobrino. 2000. Interspecies major histocompatibility complex-restricted Th cell epitope on foot-and-mouth disease virus capsid protein VP4. *J. Virol.* **74**:4902–4907.
- Blanco, E., L. J. Romero, M. El Harrach, and J. M. Sanchez-Vizcaino. 2002. Serological evidence of FMD subclinical infection in sheep population during the 1999 epidemic in Morocco. *Vet. Microbiol.* **85**:13–21.
- Borrás-Cuesta, F., Y. Fedon, and A. Petit-Camurdan. 1988. Enhancement of peptide immunogenicity by linear polymerization. *Eur. J. Immunol.* **18**:199–202.
- Bouvet, J. P., N. Decroix, and P. Pamonslapatham. 2002. Stimulation of local antibody production: parenteral or mucosal vaccination? *Trends Immunol.* **23**:209–213.
- Brocchi, E., I. E. Bergmann, A. Dekker, D. J. Paton, D. J. Sammin, M. Greiner, S. Grazioli, F. De Simone, H. Yadin, B. Haas, N. Bulut, V. Malirat, E. Neitzert, N. Goris, S. Parida, K. Sorensen, and K. De Clercq. 2006. Comparative evaluation of six ELISAs for the detection of antibodies to the non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* **24**:6966–6979.
- Carrillo, C., E. R. Tulman, G. Delhon, Z. Lu, A. Carreno, A. Vagnozzi, G. F. Kutish, and D. L. Rock. 2005. Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **79**:6487–6504.
- Collen, T. 1994. Foot-and-mouth disease (aphthovirus): viral T cell epitopes. *In* B. M. L. Goddeeris and I. Morrison (ed.), *Cell mediated immunity in ruminants*. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.
- Collen, T., R. Dimarchi, and T. R. Doel. 1991. A T cell epitope in VP1 of

- foot-and-mouth disease virus is immunodominant for vaccinated cattle. *J. Immunol.* **146**:749–755.
17. Collen, T., and T. R. Doel. 1990. Heterotypic recognition of foot-and-mouth disease virus by cattle lymphocytes. *J. Gen. Virol.* **71**:309–315.
 18. Diaz-San Segundo, F., F. J. Salguero, A. de Avila, M. M. de Marco, M. A. Sanchez-Martin, and N. Sevilla. 2006. Selective lymphocyte depletion during the early stage of the immune response to foot-and-mouth disease virus infection in swine. *J. Virol.* **80**:2369–2379.
 19. DiMarchi, R., G. Brooke, C. Gale, V. Cracknell, T. Doel, and N. Mowat. 1986. Protection of cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide. *Science* **232**:639–641.
 20. Doel, T. R. 2003. FMD vaccines. *Virus Res.* **91**:81–99.
 21. Domingo, E., M. G. Mateu, M. A. Martinez, J. Dopazo, A. Moya, and F. Sobrino. 1990. Genetic variability and antigenic diversity of foot-and-mouth disease virus, vol. 2. Academic Press Inc., London, United Kingdom.
 22. Eble, P. L., A. Bouma, K. Weerdmeester, J. A. Stegeman, and A. Dekker. 2007. Serological and mucosal immune responses after vaccination and infection with FMDV in pigs. *Vaccine* **25**:1043–1054.
 23. Francis, M. J., and L. Black. 1983. Antibody response in pig nasal fluid and serum following foot-and-mouth disease infection or vaccination. *J. Hyg.* **91**:329–334.
 24. Garcia-Briones, M. M., E. Blanco, C. Chiva, D. Andreu, V. Ley, and F. Sobrino. 2004. Immunogenicity and T cell recognition in swine of foot-and-mouth disease virus polymerase 3D. *Virology* **322**:264–275.
 25. Garcia-Briones, M. M., G. C. Russell, R. A. Oliver, C. Tami, O. Taboga, E. Carrillo, E. L. Palma, F. Sobrino, and E. J. Glass. 2000. Association of bovine DRB3 alleles with immune response to FMDV peptides and protection against viral challenge. *Vaccine* **19**:1167–1171.
 26. Gerner, W., B. V. Carr, K. H. Wiesmuller, E. Pfaff, A. Saalmuller, and B. Charleston. 2007. Identification of a novel foot-and-mouth disease virus specific T-cell epitope with immunodominant characteristics in cattle with MHC serotype A31. *Vet. Res.* **38**:565–572.
 27. Golding, S. M., R. S. Hedger, and P. Talbot. 1976. Radial immuno-diffusion and serum-neutralisation techniques for the assay of antibodies to swine vesicular disease. *Res. Vet. Sci.* **20**:142–147.
 28. Guthrie, T., C. G. Hobbs, V. Davenport, R. E. Horton, R. S. Heyderman, and N. A. Williams. 2004. Parenteral influenza vaccination influences mucosal and systemic T cell-mediated immunity in healthy adults. *J. Infect. Dis.* **190**:1927–1935.
 29. Holmgren, J., and C. Czerkinsky. 2005. Mucosal immunity and vaccines. *Nat. Med.* **11**:S45–S53.
 30. Kitching, R. P., A. M. Hutber, and M. V. Thrusfield. 2005. A review of foot-and-mouth disease with special consideration for the clinical and epidemiological factors relevant to predictive modelling of the disease. *Vet. J.* **169**:197–209.
 31. Leclerc, C. 2003. New approaches in vaccine development. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **26**:329–341.
 32. Lee, C. C., J. A. MacKay, J. M. Frechet, and F. C. Szoka. 2005. Designing dendrimers for biological applications. *Nat. Biotechnol.* **23**:1517–1526.
 33. Mateu, M. G. 1995. Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view. *Virus Res.* **38**:1–24.
 34. Meloen, R. H., J. P. Langeveld, W. M. Schaaper, and J. W. Slootstra. 2001. Synthetic peptide vaccines: unexpected fulfillment of discarded hope? *Biologicals* **29**:233–236.
 35. Moyle, P. M., R. P. McGeary, J. T. Blanchfield, and I. Toth. 2004. Mucosal immunisation: adjuvants and delivery systems. *Curr. Drug Deliv.* **1**:385–396.
 36. Mulcahy, G., C. Gale, P. Robertson, S. Iyisan, R. D. DiMarchi, and T. R. Doel. 1990. Isotype responses of infected, virus-vaccinated and peptide-vaccinated cattle to foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* **8**:249–256.
 37. Musey, L., Y. Ding, M. Elizaga, R. Ha, C. Celum, and M. J. McElrath. 2003. HIV-1 vaccination administered intramuscularly can induce both systemic and mucosal T cell immunity in HIV-1-uninfected individuals. *J. Immunol.* **171**:1094–1101.
 38. Núñez, J. I., N. Molina, E. Baranowski, E. Domingo, S. Clark, A. Burman, S. Berryman, T. Jackson, and F. Sobrino. 2007. Guinea pig-adapted foot-and-mouth disease virus with altered receptor recognition can productively infect a natural host. *J. Virol.* **81**:8497–8506.
 39. Ogra, P. L., H. Faden, and R. C. Welliver. 2001. Vaccination strategies for mucosal immune responses. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:430–445.
 40. Pasick, J. 2004. Application of DIVA vaccines and their companion diagnostic tests to foreign animal disease eradication. *Anim. Health Res. Rev.* **5**:257–262.
 41. Pereira, H. G. 1981. Foot-and-mouth disease. Academic Press Inc., London, United Kingdom.
 42. Rodriguez-Carreno, M. P., L. Lopez-Fuertes, C. Revilla, A. Ezquerro, F. Alonso, and J. Dominguez. 2002. Phenotypic characterization of porcine IFN-gamma-producing lymphocytes by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **259**:171–179.
 43. Rowlands, D. 2004. Foot-and-mouth disease virus peptide vaccines. In F. Sobrino and E. Domingo (ed.), *Foot-and-mouth disease. Current perspectives*. Horizon Bioscience, Norfolk, United Kingdom.
 44. Saiz, J. C., A. Rodriguez, M. Gonzalez, F. Alonso, and F. Sobrino. 1992. Heterotypic lymphoproliferative response in pigs vaccinated with foot-and-mouth disease virus. Involvement of isolated capsid proteins. *J. Gen. Virol.* **73**:2601–2607.
 45. Saiz, M., D. B. De La Morena, E. Blanco, J. I. Nunez, R. Fernandez, and J. M. Sanchez-Vizcaino. 2003. Detection of foot-and-mouth disease virus from culture and clinical samples by reverse transcription-PCR coupled to restriction enzyme and sequence analysis. *Vet. Res.* **34**:105–117.
 46. Salt, J. S. 1993. The carrier state in foot and mouth disease—an immunological review. *Br. Vet. J.* **149**:207–223.
 47. Salt, J. S., G. Mulcahy, and R. P. Kitching. 1996. Isotype-specific antibody responses to foot-and-mouth disease virus in sera and secretions of “carrier” and “non-carrier” cattle. *Epidemiol. Infect.* **117**:349–360.
 48. Samuel, A. R., and N. J. Knowles. 2001. Foot-and-mouth disease virus: cause of the recent crisis for the UK livestock industry. *Trends Genet.* **17**:421–424.
 49. Sanz-Parra, A., M. A. Jimenez-Clavero, M. M. Garcia-Briones, E. Blanco, F. Sobrino, and V. Ley. 1999. Recombinant viruses expressing the foot-and-mouth disease virus capsid precursor polypeptide (P1) induce cellular but not humoral antiviral immunity and partial protection in pigs. *Virology* **259**:129–134.
 50. Sobrino, F., M. Davila, J. Ortin, and E. Domingo. 1983. Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology* **128**:310–318.
 51. Sobrino, F., and E. Domingo. 2001. Foot-and-mouth disease in Europe. *EMBO Rep.* **2**:459–461.
 52. Sobrino, F., M. Saiz, M. A. Jimenez-Clavero, J. I. Nunez, M. F. Rosas, E. Baranowski, and V. Ley. 2001. Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. *Vet. Res.* **32**:1–30.
 53. Taboga, O., C. Tami, E. Carrillo, J. I. Nunez, A. Rodriguez, J. C. Saiz, E. Blanco, M. L. Valero, X. Roig, J. A. Camarero, D. Andreu, M. G. Mateu, E. Giralt, E. Domingo, F. Sobrino, and E. L. Palma. 1997. A large-scale evaluation of peptide vaccines against foot-and-mouth disease: lack of solid protection in cattle and isolation of escape mutants. *J. Virol.* **71**:2606–2614.
 54. Tam, J. P. 1996. Recent advances in multiple antigen peptides. *J. Immunol. Methods* **196**:17–32.
 55. Tam, J. P., Y. A. Lu, and J. L. Yang. 2002. Antimicrobial dendrimeric peptides. *Eur. J. Biochem.* **269**:923–932.
 56. Thompson, J. M., A. C. Whitmore, J. L. Konopka, M. L. Collier, E. M. Richmond, N. L. Davis, H. F. Staats, and R. E. Johnston. 2006. Mucosal and systemic adjuvant activity of alphavirus replicon particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:3722–3727.
 57. Toja, M., C. Escarmis, and E. Domingo. 1999. Genomic nucleotide sequence of a foot-and-mouth disease virus clone and its persistent derivatives. Implications for the evolution of viral quasispecies during a persistent infection. *Virus Res.* **64**:161–171.
 58. van Lierop, M. J., K. van Maanen, R. H. Meloen, V. P. Rutten, M. A. de Jong, and E. J. Hensen. 1992. Proliferative lymphocyte responses to foot-and-mouth disease virus and three FMDV peptides after vaccination or immunization with these peptides in cattle. *Immunology* **75**:406–413.
 59. Van Noort, J. M., J. Boon, A. C. Van der Drift, J. P. Wagenaar, A. M. Boots, and C. J. Boog. 1991. Antigen processing by endosomal proteases determines which sites of sperm-whale myoglobin are eventually recognized by T cells. *Eur. J. Immunol.* **21**:1989–1996.
 60. Zhang, Z. D., G. Hutching, P. Kitching, and S. Alexandersen. 2002. The effects of gamma interferon on replication of foot-and-mouth disease virus in persistently infected bovine cells. *Arch. Virol.* **147**:2157–2167.